

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Estructura Genética de la población de merluza  
meruana (*Merluccius Gayi Peruanus*) (Primavera,  
2001) usando variantes de secuencia de la región de  
control Mitocondrial**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Genética**

**AUTOR**

**Daniel Saúl Oré Chávez**

**Lima – Perú**

**2011**



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN GENÉTICA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

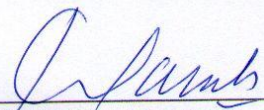
Siendo las 18:15 horas del 15 de febrero de 2011, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Genética** de **DANIEL SAÚL ORÉ CHÁVEZ**.

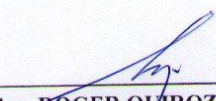
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 047-EAPCB-2010, el titulando expuso su tesis: **"ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE MERLUZA PERUANA (*Merluccius gayi peruanus*) (PRIMAVERA, 2001) USANDO VARIANTES DE SECUENCIA DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20, calificativo: SOBRESALIENTE CON MENCIÓN.

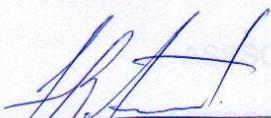
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo con mención en **Genética** a **DANIEL SAÚL ORÉ CHÁVEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

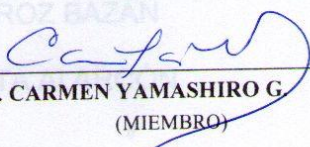
Siendo las 20:05 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 15 de febrero de 2011.

  
Dr. JULIO MANOSALVA B.  
(PRESIDENTE)

  
Blgo. ROGER QUIROZ BAZAN  
(ASESOR)

  
Mg. FERNANDO RETUERTO P.  
(MIEMBRO)

  
Blga. CARMEN YAMASHIRO G.  
(MIEMBRO)

Lima - Perú

2011



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE  
MERLUZA PERUANA (*Merluccius gayi peruanus*)  
(PRIMAVERA, 2001) USANDO VARIANTES DE SECUENCIA  
DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL**

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con Mención en  
Genética

Bach. DANIEL SAÚL ORÉ CHÁVEZ

ASESOR Blgo ROGER QUIROZ BAZÁN

ASESOR Dr. RICARDO FUJITA ALARCÓN

Lima – Perú

2011

## DEDICATORIA

“UN MUNDO TAN CERCANO AL  
TUYO ES MÁS DIFÍCIL DE  
RECONOCER QUE UNO ALEJADO”

Este trabajo es dedicado a mi abuelos Regina y Saúl, a mis padres Haydeé Chávez Galagarza y Daniel Oré Villalba, y a mi hermano Iván Oré Chávez, que forjaron en mí el espíritu luchador, explorador y soñador, es decir el de un ser humano.

Mis padres en secreto me prepararon para afrontar los vaivenes de la vida, con su apoyo incondicional, consejos y sacrificio, aspectos invaluable que trascenderán a mi existencia.

El presente trabajo es el nacimiento del segundo sueño concebido desde mi niñez, entre las primeras salidas de campo al Río Lurín, la primera respuesta que me dio una PC: “*syntax error*”, el primer libro de genética que mi padre me brindó a los 12 años y mis primeros experimentos de genética en chanchitos de tierra y camarón de río.

Los sucesos de la vida son cinceladas que van delineando poco a poco el futuro personal y comunal, así como los eventos terrestres moldean la estructura de nuestras poblaciones, fenómenos semejantes que actúan a diferente nivel.

## AGRADECIMIENTOS

Mi madre me enseñó durante la primaria y primeros años de la secundaria, mi padre lo fue en la secundaria y la universidad. Y en mis momentos difíciles a parte de mis padres y amigos, uno en especial me ayudó, el Blgo. Roger Quiroz Bazán, me brindo su laboratorio en el cual pasaron infinidad de historias y anécdotas, iniciando así la aventura, con una llamada telefónica: *“Daniel, tus compañeros se retiran, no te prometo nada, entenderé tu respuesta”*, a lo que respondí: *“Profesor, para adelante no más, será divertido”*. Mi vida transcurría entre mis actividades de profesor e investigación, la primera financiaba la segunda.

Un agradecimiento a Felipe Hernán Mendoza e Iván, amigos con los cuales corregíamos la redacción del proyecto, a la Dra. Beatriz Lizárraga que anecdóticamente nos dio una recomendación en el Rectorado mientras había una movilización estudiantil fuera. Era una aventura cada día, en concebir la idea, en materializarla en papel, en darle sentido lógico, en plantear el problema, en tener el pasaje para movilizarme, en comer. Algunos amigos me decían que no pierda el tiempo en eso, que vaya a algo fijo y estable, pero aun así se siguió hasta tener un escrito formulado, era el 2001. Gracias a todos por vivir esa aventura.

Teníamos el problema formulado, una propuesta de estrategia de estudio, la facilidad para el muestreo biológico y claro, la disponibilidad del personal, pero no el instrumental y la experiencia para la ejecución. Tocamos puertas, y la recomendación general era cambiar de tema. Hasta que Hernán se enteró... aquí ingresa en la historia el Dr. Ricardo Fujita Alarcón: *“Bueno Daniel, cuándo inicias la investigación”*, sorprendido respondí: *“Mañana”*. La Dra. Ana Hurtado Alendes, me instruyó en los primeros pasos de la genética molecular de la cual conocía solo aspectos teóricos. Además tuve la oportunidad de aprender de personas como José Raúl Sandoval, María Luisa Guevara, Alejandro Estrada (el del SSCP, ya lo sabrán adelante) y Bedsabé Delgado, amigos a los que considero y valoro bastante.

En el 2002, accedimos a un primer fondo de 45 000 nuevos soles para elaborar la investigación, usando SSCP en merluza, por parte de IMARPE. Posteriormente, fondos menores nos daban insumos para que la investigación continúe. Un día el Dr. Ricardo Fujita me dice: *“Te espero si ó si, para que vengas a trabajar al Centro”*, dejé el colegio, ya era el 2006. Seguíamos con los pequeños fondos, hasta que ganamos unos fondos sanmarquinos denominados Proyectos Multidisciplinarios con el cual compramos muchos insumos que hasta ahora usamos, inclusive los marcadores empleados en este trabajo. Después vino el Proyecto de Interés Nacional financiado por el FINCyT-BID 060-2008, con el cual se pudo resecuenciar los marcadores genéticos para el presente estudio.

Es así que mis padres cimentaron mis valores a la vida, Roger Quiroz y Ricardo Fujita, me dieron las herramientas para poder acercarme a mis metas. Todo tiene su historia y cada quien su papel en ella, ese es el verdadero reconocimiento que puedo dar con este primer trabajo, porque la verdad, faltan varios más.

Finalmente quiero terminar agradeciendo a Dios, por la oportunidad de vida que me ha dado, por acompañarme sin yo saberlo, por forzarme a probar mi fortaleza, por enviarme a personas que creyendo o no en mí, han tenido el mensaje adecuado para el momento preciso.

## INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCION .....	1
II.	MARCO TEÓRICO .....	3
2.1.	Posición Taxonómica de la Merluza Peruana. ....	3
2.2.	Distribución Geográfica en la Merluza Peruana. ....	6
2.3.	Aspectos bio-ecológicos en la merluza. ....	7
2.4.	Sinopsis de la pesquería de la merluza peruana. ....	10
2.5.	Estudios Genético Moleculares en Merlúcidos.....	11
2.6.	Estudios Genéticos Moleculares en <i>Merluccius gayi</i> . ....	12
2.7.	Historia Biogeográfica de las Merluzas del Pacífico.....	12
2.8.	Historia Biogeográfica de <i>Merluccius gayi</i> . ....	14
2.9.	Estudios Genéticos Moleculares en el Manejo Pesquero .....	15
2.10.	El ADN mitocondrial como Marcador Genético.....	16
2.11.	Técnica de Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP). ....	19
2.12.	La Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	21
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	23
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
4.1.	Lugar de Ejecución.....	24
4.2.	Obtención de Material Genético .....	24
4.3.	Empleo de marcadores genéticos mitocondriales.....	31
4.4.	Optimización de las Reacciones de Amplificación por PCR.....	37
4.5.	Evaluación de técnicas que permitan la detección de mutaciones (polimorfismos de longitud y polimorfismos de secuencia). ....	38
4.6.	Análisis de Variantes de Longitud y de Secuencia por SSCP. ....	41
4.7.	Análisis Bioinformático de las Secuencias de la Región de Control. ....	42
V.	RESULTADOS. ....	47
5.1.	Caracterización de la Muestra Biológica.....	47
5.2.	Cebadores Mitocondriales de PCR para SSCP y Secuenciamiento. ....	47
5.3.	Polimorfismos de Longitud en la HVI.....	51
5.4.	Polimorfismos de SSCP y su Distribución en la Población.....	52
5.5.	Polimorfismos SSCP vs Polimorfismos de Secuencia. ....	57
5.6.	Diversidad Genética de la Región de Control Mitocondrial.....	58

5.7.	Análisis de Diferenciación y Estructura Poblacional. ....	61
5.8.	Análisis Filogenético y Haplotípico. ....	64
5.9.	Cambios Demográficos en la Población de merluza. ....	67
VI.	DISCUSIÓN.....	71
6.1.	Sensibilidad de la Técnica de SSCP. ....	71
6.2.	Subdivisión Poblacional de la Merluza. ....	73
6.3.	Otras Explicaciones a la Hipótesis de dos Stocks. ....	74
6.4.	Posibles Linajes Mitocondriales.....	75
6.5.	Estabilidad de los Tamaños Poblacionales de la Merluza. ....	76
6.6.	Implicancias del Estudio al Manejo Pesquero.....	77
VII.	CONCLUSION.....	81
VIII.	RECOMENDACIONES. ....	82
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83



## INDICE DE TABLAS

### Sección Material y Métodos.

TABLA T 1. DATOS BIOLÓGICOS – PESQUEROS Y UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL MUESTREO EFECTUADO A BORDO DEL BIC-HUMBOLDT (10-29 SET, 2001) Y A BORDO DE EMBARCACIONES ARTESANALES. ....	27
TABLA T 2. CEBADORES HVI DE MERLÚCIDOS EMPLEADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.....	33
TABLA T 4. COMBINACIONES EXPERIMENTALES DE SSCP EN LO QUE SE VARÍO EL PORCENTAJE DE POLIACRILAMIDA, LA PRESENCIA/AUSENCIA DE GLICEROL, CON LA LONGITUD DE LA CORRIDA. ....	41

### Sección Resultados.

TABLA R 1. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS OBTENIDOS.....	48
TABLA R 2 PORCENTAJE DE PB ANALIZADOS EN LAS DOS TÉCNICAS USADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO: SSCP Y SECUENCIAMIENTO. ....	51
TABLA R 3. FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES SSCP DETECTADAS EN LA POBLACIÓN USANDO LOS FRAGMENTOS MG Y CB. ....	54
TABLA R 4. DISTRIBUCIÓN DE LOS SITIOS NUCLEOTÍDICOS DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL.....	58
TABLA R 5. HAPLOTIPOS DETECTADOS EN LA MERLUZA PERUANA, BASADOS EN LA SECUENCIA DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL.....	59
TABLA R 6. ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN TRES JERARQUÍAS POBLACIONALES: LOCALIDAD, GRUPAL Y TOTAL. ....	60
TABLA R 7. VALORES P DEL TEST EXACTO DE DIFERENCIACIÓN ENTRE PARES POBLACIONALES Y GRUPOS.....	61
TABLA R 8. ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR BASADO ENTRE DISTINTAS JERARQUÍAS POBLACIONALES.....	62
TABLA R 9. VALORES DE DOS ESTADÍSTICOS DE DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL Y DE FLUJO GÉNICO ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS POBLACIONALES. ....	64
TABLA R 10. ÍNDICES DE NEUTRALIDAD DE TRES ESTADÍSTICOS $D_T$ , $R_2$ Y $F_U$ 'S $F_S$ EN LA POBLACIÓN TOTAL. ....	68

## INDICE DE FIGURAS

### Sección Marco Teórico.

FIGURA M 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA Y DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA EN <i>Merluccius gayi</i> .....	5
---	---

### Sección Material y Métodos.

FIGURA T 1. LUGARES DE MUESTREO DE MERLUZA DURANTE CRUCERO DE INVESTIGACIÓN BIC 01-09 HUMBOLDT (IMARPE) DEL 10 AL 29 DE SEPTIEMBRE DE 2001. LA DISTANCIA LINEAL ENTRE LOS EXTREMOS GEOGRÁFICOS (L52 Y L40) ES DE 400 KM. ....	26
FIGURA T 2. ESQUEMA DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL, SE INDICA LOS TRES DOMINIOS: EL DOMINIO HIPERVARIABLE IZQUIERDO O HVI, EL DOMINIO CENTRAL Y EL DOMINIO HIPERVARIABLE DERECHO O HV II. ....	31
FIGURA T 3. ALINEAMIENTOS DE LAS SECUENCIAS AF112245 A AF112255 DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE IZQUIERDA DEL D-LOOP MITOCONDRIAL DE LOS MERLÚCIDOS. EN LETRA NEGRITA SE INDICA LA SECUENCIA DE LOS PRIMERS Y CON LAS FLECHAS LA UBICACIÓN DE ESTOS. ....	35
FIGURA T 4 UBICACIÓN DEL PRIMER HARN12, DESARROLLADO EN EL PRESENTE ESTUDIO PARA PODER AMPLIFICAR LA TOTALIDAD DE LA REGIÓN DE CONTROL DE LA MERLUZA. ....	39

### Sección Resultados.

TABLA R 1. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS OBTENIDOS.....	48
TABLA R 2 PORCENTAJE DE PB ANALIZADOS EN LAS DOS TÉCNICAS USADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO: SSCP Y SECUENCIAMIENTO.....	51
TABLA R 3. FRECUENCIAS DE LAS VARIANTES SSCP DETECTADAS EN LA POBLACIÓN USANDO LOS FRAGMENTOS MG Y CB.....	54
TABLA R 4. DISTRIBUCIÓN DE LOS SITIOS NUCLEOTÍDICOS DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL.....	58
TABLA R 5. HAPLOTIPOS DETECTADOS EN LA MERLUZA PERUANA, BASADOS EN LA SECUENCIA DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL.....	59
TABLA R 6. ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN TRES JERARQUÍAS POBLACIONALES: LOCALIDAD, GRUPAL Y TOTAL.....	60
TABLA R 7. VALORES P DEL TEST EXACTO DE DIFERENCIACIÓN ENTRE PARES POBLACIONALES Y GRUPOS.....	61
TABLA R 8. ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR BASADO ENTRE DISTINTAS JERARQUÍAS POBLACIONALES.....	62
TABLA R 9. VALORES DE DOS ESTADÍSTICOS DE DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL Y DE FLUJO GÉNICO ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS POBLACIONALES.....	64

TABLA R 10. ÍNDICES DE NEUTRALIDAD DE TRES ESTADÍSTICOS $D_T$ , $R_2$ Y $F_U$ 'S $F_S$ EN LA POBLACIÓN TOTAL.....	68
--	----

## **Sección Discusión.**

FIGURA D 1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS CLADOS A Y B DE LA MERLUZA PERUANA.....	80
---	----

## RESUMEN

La merluza peruana (*Merluccius gayi peruanus*) sostiene una pesquería importante en el país. Actualmente la evaluación y manejo de este recurso asume la presencia de un solo stock en el mar norperuano, sin embargo, observaciones realizadas en 1997 sugieren la existencia de dos stocks, al norte y sur del paralelo 6°S. El objetivo del presente estudio es evaluar mediante el uso de marcadores mitocondriales la presencia de una o dos unidades poblacionales de merluza, para lo cual se amplificó la región de control mitocondrial parcial y completa, detectándose las variantes con dos técnicas Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) y secuenciamiento directo, respectivamente. Se observa una alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, con una escasa diferenciación y estructura genética, con la presencia de dos posibles líneas matrilineales yuxtapuestas geográficamente. Así mismo existe evidencia de que la población atravesó un reciente evento de expansión poblacional a finales del Pleistoceno. En conclusión, la merluza peruana comprende una sola unidad panmíctica en el mar norperuano sin presencia de una estructuración genética en sus poblaciones, lo cual apoya la hipótesis de un solo stock, siendo necesario el empleo de otros marcadores como los microsatélites para efectuar análisis multilocus a fin de tener mayores criterios que apoyen la hipótesis.

Palabras clave: *Merluccius*, Merluza peruana, ADN mitocondrial, dinámica poblacional.

## ABSTRACT

Peruvian hake (*Merluccius gayi peruanus*) supports a major fishery in the country. Currently the evaluation and management of this resource assumes the presence of a single stock in the north peruvian sea, however, observations in 1997 suggests the existence of two stocks in the north and south of 6 ° S. The aim of this study is to evaluate using mitochondrial markers the presence of one or two units of hake population, which was amplified for the mitochondrial control region of partial and complete, detected with two techniques: Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) and sequencing, respectively. A high haplotype diversity and low nucleotide diversity, with differentiation and structure genetic low, with the possible presence of two matrilineal lines juxtaposed geographically. Likewise there is evidence that the population underwent a recent population expansion event in the late Pleistocene. In conclusion, the Peruvian hake comprises a single panmictic unit north peruvian sea without the presence of genetic structure in populations, which supports the hypothesis of a single stock, requiring the use of other markers such as microsatellites for analysis to multilocus to have better criteria to support the hypothesis.

Key words: Peruvian hake, *Merluccius*, AND mitochondrial, dynamics of populations.



## I. INTRODUCCION

La merluza peruana (*Merluccius gayi peruanus*) es una especie bento pelágica que se distribuye sobre la plataforma y parte del talud continental, con las principales concentraciones hacia el norte de 10°S, siendo la plataforma continental norperuana su área de reproducción ([Samamé et al., 2001](#)). Su pesquería sostiene una industria dedicada a la exportación y al consumo humano directo ([Flores, 2001](#)).

Actualmente, la evaluación y manejo de este recurso asume la presencia de un solo stock en el mar norperuano, caracterizado por un gradiente latitudinal de tallas. Pero observaciones realizadas por [Guevara-Carrasco \(1997\)](#) durante el crucero de evaluación BIC Humboldt 9705-06, y posteriormente analizadas por [Wostinza-Mendo & Guevarra-Carrasco \(2000\)](#), sugieren la existencia de dos stocks al norte y sur del paralelo 6° S, cada uno con su propio gradiente latitudinal de tallas, distinto grado de madurez sexual y espectro alimentario; siendo posible que el grupo del norte pueda ser *Merluccius angustimanus*, que se distribuye frente a Centroamérica y que podría haber migrado al sur a consecuencia de El Niño. Si esta última hipótesis es cierta, sería posible detectar diferencias significativas a un nivel molecular, pero no se dispone de los insumos primarios para este estudio que son los marcadores genéticos en esta especie.

En el país los indicadores usados para la identificación de unidades poblacionales provienen de estudios biológicos pesqueros fenotípicos (merística, estadio reproductivo, alimentación), que son susceptibles a cambiar con las variaciones del entorno. Estos caracteres se expresan como una respuesta adaptativa al ambiente, lo cual puede no implicar cambios significativos en el genoma, lo que puede conducir a agrupar individuos en unidades discretas a pesar de que no existan diferencias genéticas. Mientras que en el estado actual del arte se usan marcadores genotípicos que son invariables a través de la vida del individuo (huevo a adulto),

independientemente de las variaciones del entorno, además que permiten determinar relaciones de parentesco y/o diferenciación entre las poblaciones.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la presencia de una o dos unidades poblacionales de merluza entre los paralelos 3°30`S y 07°16`S, que comprende el rango de distribución de la especie durante la primavera del 2001 (Crucero IMARPE – BIC Humboldt Sep / 2001). Para ello se propone generar marcadores genéticos que en conjunto con los reportados en otras especies, permitan la detección de variantes genéticas en la región de control mitocondrial de la merluza peruana. Primero se buscaran polimorfismos de longitud y después se buscaran variantes de secuencia usando: Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) y secuenciamiento directo. Así las diferencias que se detecten podrán ser analizadas estadísticamente para contrastar la hipótesis nula de una sola unidad genética poblacional.

La investigación es innovadora en nuestro país en utilizar marcadores genéticos mitocondriales con la finalidad de aclarar una situación problemática en el manejo pesquero. Y así mismo es concebida como una propuesta a extrapolar para el estudio del componente genético de nuestras poblaciones.



## II. MARCO TEÓRICO

Según [Grosberg y Cunningham \(2001\)](#), el medio marino es un medio homogeneizador de las distintas poblaciones acuáticas, las que se hallan distribuidas desigualmente en parches, que se mantienen conectados entre sí a través de grandes ó pequeñas extensiones mediante dispersión. Este grado de conectividad de las poblaciones afecta a su estructura genética la cual va a reflejar la interacción histórica y contemporánea de un complejo conjunto de procesos ecológicos, demográficos, etológicos, genéticos, oceanográficos, climáticos y tectónicos, que actúan en forma combinada a través de escalas temporales y espaciales, determinando tasas y patrones de dispersión de gametos, cigotos, larvas y adultos. Estos movimientos en conjunto con la reproducción de los inmigrantes, controlan el grado y proporción de los procesos estocásticos (p.e. deriva genética) y determinísticos (p.e. selección natural) los cuales modifican la estructura dentro y entre grupos de individuos.

La documentación científica que reporta estudios genéticos poblacionales en diversos recursos hidrobiológicos es extensa ([Muths et al., 2009](#); [Neethling et al., 2008](#); [Rodrigues et al., 2008](#); [Carr y Marshall 2008](#); [Heyden et al., 2007](#); [Ward et al., 2001](#); [McLean y Taylor, 2001](#); [Jónsdóttir et al., 2001](#); [Orbacz y Gaffney, 2000](#); [Lankford et al., 1999](#); [Heist y Gold, 1999](#); [Stabile et al., 1996](#); [Sang et al., 1994](#); [Palumbi y Baker, 1994](#); [Ruzzante et al., 1998](#); otros).

### 2.1. Posición Taxonómica de la Merluza Peruana.

[Mejia et al. \(1974\)](#) determina merísticamente en la merluza (*Merluccius gayi peruanus*), la igualdad del número de radios (aletas dorsal y anal) en toda el área de distribución donde opera la flota pesquera peruana, sustentando su identidad poblacional. Coincidiendo con la categorización dada por [Ginsburg \(1954\)](#) . Su posición taxonómica es la siguiente:

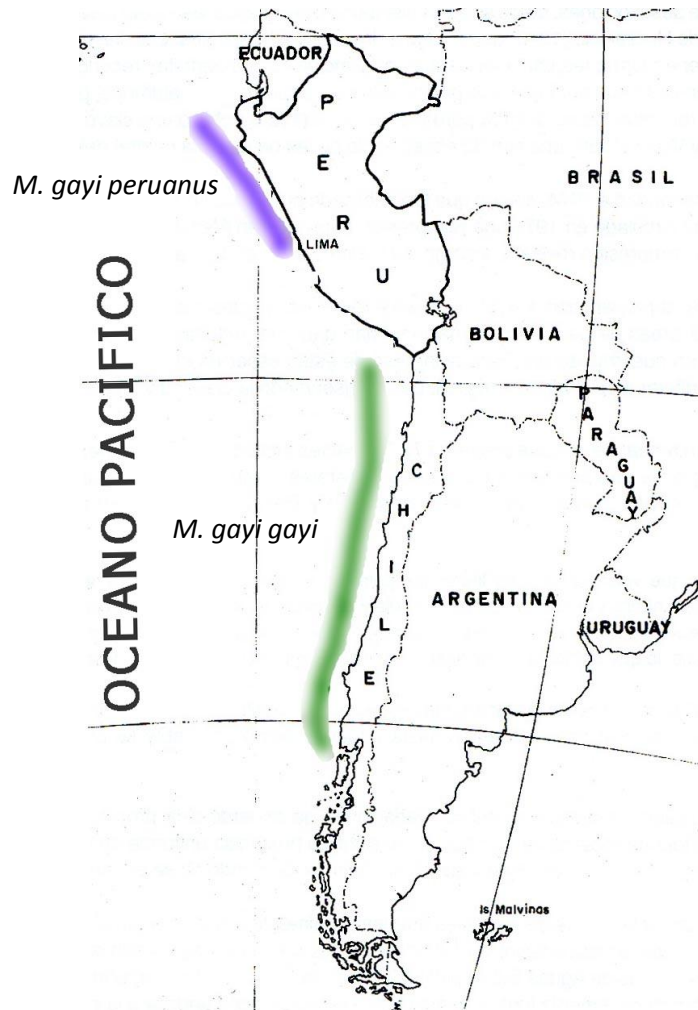
Phylum : Vertebrata  
Subphylum : Craniata  
Superclase : Ganthostomata  
Clase : Teleostomi  
Superorden : Paracanthopterygii  
Orden : Gadiformes  
Suborden : Gadoidea  
Familia : Merlucciidae  
Género : Merluccius  
Especie : *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848).  
Subespecie : *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954).

La especie *Merluccius gayi* habita en la costa este del Pacífico que comprende tanto la costa peruana y chilena ([Cohen et al., 1990](#)). [Ginsburg \(1954\)](#) reconoció dos subespecies en *Merluccius gayi*: ([Figura M1](#)).

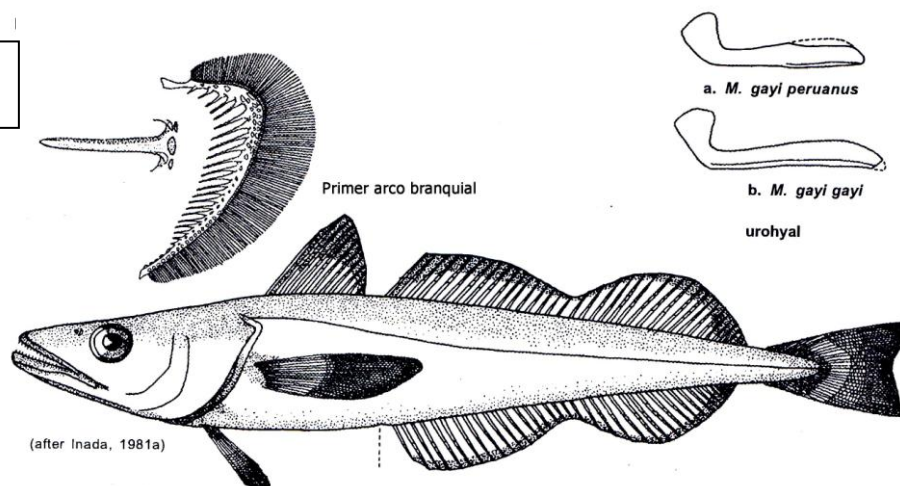
- a. *Merluccius gayi gayi* (Guichenot 1848)
- b. *Merluccius gayi peruanus* (Ginsburg, 1954)

Ambas subespecies muestran una distribución alopátrica, con una separación mínima de 1300Km ([Hernández et al., 2000](#)). [Cohen et al. \(1990\)](#) cita como caracteres distintivos el número total de vértebras, número total de branquiespinas y longitud relativa de la cabeza. La distribución alopátrica, la información genética poblacional, la existencia de locis proteicos propios a cada subespecie, caracteres merísticos (número de branquiespinas, vértebras, longitud de cabeza) como el número promedio de sustituciones alélicas que es el resultado de la evolución de los taxos, permiten confirmar la categoría a lo menos subespecífica para las merluzas chilena y peruana ([Hernández et al., 2000](#)), la cual fue originalmente propuesta por [Ginsburg \(1954\)](#).

**A**



**B**



**Figura M 1. Ubicación Geográfica y Diferenciación Morfológica en *Merluccius gayi*.**

- (a) Ubicación alopátrica de las subespecies de *Merluccius gayi* en la costa del Pacífico Sur.
- (b) Caracteres distintivos entre *Merluccius gayi peruanus* y *Merluccius gayi gayi* (Fuente: [Cohen et al., 1990](#)).

## 2.2. Distribución Geográfica en la Merluza Peruana.

[Castillo et al \(2001\)](#) comenta los siguientes patrones de distribución, los cuales están en función al desplazamiento de la mínima de oxígeno, posición que a su vez estará determinada por la Corriente Submarina Peruana ó Extensión Sur de la Corriente de Cromwell (ESCC):

a. *Distribución Estándar: desde los 00°30'S (Ecuador) hasta los 13° 56'S (Perú).*

b. *Distribución Estacional*

Invierno - Primavera : Se observa una retracción al norte hasta los 06 y 08°S.

Verano – Otoño : Se extiende al sur hasta inclusive los 12 y 14°S.

c. *Distribución Anómala:*

El Niño : Se extiende más al sur hasta los 15°S o 18°S.

La Niña : La población se extiende hacia el norte hasta las costa ecuatorianas

La ESCC se caracteriza por su relativa alta salinidad y elevado contenido de oxígeno, con un desplazamiento de norte a sur favoreciendo el desarrollo y distribución de la población de merluza y otros recursos demersales. Su distribución se ve alterada estacionalmente y por condiciones oceanográficas correspondiente a fenómeno El Niño o La Niña.

La merluza peruana presenta una distribución latitudinal estratificada por tallas es decir, los ejemplares más grandes están al norte de los 06° S, mientras que los más pequeños se encuentran al sur de este punto. Así en las áreas de mayor concentración (05 y 06°S) hallaremos a los ejemplares de tallas medianas (30-40 cm), constituyendo la parte más importante del stock, en áreas en donde las condiciones ambientales son las mejores ([Armstrong, 1981](#)). Pero esta estructura de talla sufre un desplazamiento durante un evento El Niño o La Niña, pero permanece un patrón de reclutamiento paulatino de sur a norte ([Castillo et al., 2001](#)).

## **2.3. Aspectos bio-ecológicos en la merluza.**

### **2.3.1. Morfología y merística de las merluzas.**

Estas especies tienen un alto grado de conservación morfológica ([Cohen et al. 1990](#)). La conformación general del cuerpo de todas ellas no ofrece grandes variaciones a primera vista, siendo los caracteres merísticos (vértebras, escamas y branquiespinas) los que categóricamente delimitan la segregación taxonómica entre estas especies ([Minaya, 2001](#)).

### **2.3.2. Capacidad migracional de la merluza peruana.**

Las merluzas en general presentan una amplia capacidad para realizar migraciones verticales debido a adaptaciones fisiológicas en la vejiga natatoria y en el sistema circulatorio, permaneciendo durante el día cerca del fondo y desplazándose en la noche hacia aguas medias y superficiales para alimentarse siendo en este momento accesibles a la pesquería ([Minaya 2001](#)).

Según [Castillo et al \(2001\)](#), la merluza peruana presenta tres tipos de migración:

**a) Migración nictemeral diaria.** La merluza realiza migraciones verticales, en relación con la migración del zooplancton con tendencia a concentrarse sobre el piso de la plataforma durante el día y a desplazarse a lo largo de la columna de agua, durante la noche, para alimentarse.

**b) Migración batimétrica.** Análisis de las capturas comerciales y de cruceros de investigación evidencian que parte del stock se encuentra al borde y fuera de la plataforma continental, como una distribución de continuidad horizontal a partir de los 200 m de profundidad. Aparentemente estas existencias forman parte del comportamiento migratorio hacia mayores profundidades y a zonas inaccesibles, que no se conocen aún en detalle. Sin embargo, estos podrían ser los principales reproductores que asegurarían parte de la renovación poblacional.

**c) Migración latitudinal.** Producido el desove los huevos y larvas son trasladados hacia el sur hasta los 12-14°S, para luego ir creciendo desplazándose hacia el norte e irse reclutando a las diferentes áreas de pesca, paulatinamente. Esta migración caracteriza la estratificación por tallas por áreas, lo cual evidencia la migración por reclutamiento.

### **2.3.3. Reproducción de la merluza peruana.**

La merluza peruana presenta un dimorfismo sexual. Las hembras alcanzan tallas más grandes que los machos. La mayor intensidad de los desoves ocurren en el invierno austral (julio-setiembre), confirmando la existencia de individuos reproductores en menores proporciones durante todo el año. La longitud de la primera madurez ha cambiado con la disminución de la abundancia del stock en la merluza peruana de 1989 al 2000, sufriendo variaciones con una disminución de 55 a 33cm, es decir con una reducción media anual de 2cm ([Samamé et al., 2001](#)). Actualmente en ausencia de individuos mayores, los pequeños que fueron reproductivamente inactivos en la década del 80, ahora son reproductivamente activos. Se propone que esta modificación en el comportamiento reproductivo podría ser un mecanismo para hacer frente a la disminución de la fecundidad ([Wostinza-Mendo & Guevarra-Carrasco 2000](#)).

El área histórica de la distribución de los primeros estados de desarrollo de la merluza se encuentra principalmente entre Cabo Blanco (04°S) y Pimentel (07°S) con las mayores concentraciones de huevos frente a Pimentel. Las larvas tienen una mayor amplitud en su distribución tanto hacia el sur como hacia el oeste. Por el sur en un periodo normal se encuentran hasta los 08°38'S, sin embargo en determinados periodos esta distribución se ha ampliado mucho más al sur como en los años 1972 y 1983 cuando se notó su máxima amplitud hasta los 18°S.

#### **2.3.4. Alimentación.**

[Wostinza-Mendo y Guevarra-Carrasco \(2000\)](#), describe que los merlúcidos son típicos predadores pelágicos de rápidos movimientos, emboscando a sus presas en la columna de agua. Aunque es un pez demersal no se alimenta de organismos bentónicos o relacionados al sustrato, realizando migraciones verticales para alimentarse en aguas medias o de superficie durante la noche. La composición dietética depende del tamaño del individuo así por ejemplo las larvas se alimentan de copépodos, los juveniles revelan mediante el contenido estomacal, preferencias por crustáceos tales como copépodos y eufausidos y finalmente los adultos son principalmente piscivoros (uno de sus principales items alimenticios lo componen otras merluzas) pero también se alimentan de calamares y eufausidos. Entre 1976 y 1986, se ha observado que el principal alimento de los juveniles fueron eufasidos, mientras que en la merluza adulta fueron los peces (98%, sardina, bereche y anchoveta) y crustáceos (2%). Este patrón cambio en los 90's, donde los eufasidos son el principal alimento de los juveniles, pero la merluza adulta ha cambiado su dieta a Myctophidae y especies de peces sin identificar (posiblemente abisales), con poco consumo o total ausencia de sardina y bereche..

#### **2.3.5. Canibalismo**

La mayoría de especies de merlúcidos practican el canibalismo. Este evento se intensifica cuando las distribuciones de los individuos grandes y pequeños se traslapan. Por ejemplo en el caso de *M. productus* las migraciones que realiza en la corriente de California, mantienen a los individuos grandes alejados de los criaderos durante la mayor parte del año.

[Espinoza \(2001\)](#), otorga un rol regulador del tamaño poblacional al canibalismo, después de observar que esta interacción se incrementa al producirse el reclutamiento durante invierno y primavera y por lo tanto aumenta la densidad y

el área se ve reducida. Caso contrario sucede durante un evento "El Niño" donde se incrementa el área de distribución, favoreciéndose la incorporación de reclutas a la población, debido a una mayor separación de las poblaciones de juveniles y adultos.

#### **2.4. Sinopsis de la pesquería de la merluza peruana.**

En el Perú, la pesquería de la merluza (*Merluccius gayi peruanus*) comienza a mediados de los 60. Desde entonces los desembarques de merluza se incrementaron vertiginosamente, principalmente debido a embarcaciones arrastreras y de cerco para su captura ([Guevara-Carrasco, 1995](#) y [Guevara-Carrasco, 1996](#)). Es así que a partir de la década del 60 la explotación del recurso merluza aumenta, llegando a niveles de sobreexplotación en 1978-1981 ([Espino, 1999](#)), que llevaron al recurso a un colapso. A partir de 1992, se ha observado un declive en las tallas de captura, de 38-40 cm, a 30-33 cm (macho-hembra); después de una recuperación en 1994, este declive persiste. Estudios de biomasa muestran que en los últimos años también hay en declive a la mitad de la biomasa de 1980s ([Wostinza-Mendo y Guevara-Carrasco, 2000](#)). Por otro lado, los cruceros de evaluación de los recursos demersales ponen en evidencia que la frecuencia de ocurrencia en las capturas de las principales especies de la fauna acompañante de la merluza son cada vez menores, observación coherente con la tendencia a la disminución de los desembarques y cambios en la estructura por tallas y edades de las capturas de merluza.

La pesquería en el Perú como principal fuente de información pone en evidencia algunos aspectos notables como son la disminución de los desembarques de las principales especies demersales: coco, cachema, cabrilla, tollo, falso volador; y los cambios en la estructura por tallas y edades de las capturas de merluza. Por otro lado, los cruceros de evaluación de los recursos demersales ponen en evidencia que la frecuencia en las capturas de las principales especies de la fauna acompañante de



la merluza son cada vez menores, observación coherente con la tendencia a la disminución de los desembarques.

Aunque lo mencionado en el párrafo anterior a primera vista puede constituir un síntoma de sobreexplotación, algunos indicadores señalan que lo que estaría ocurriendo es un cambio a nivel de lo que se podría denominar la estructura del sistema demersal (esto es, el conjunto de peces que se capturan con frecuencia en las redes de arrastre y que no necesariamente pueden constituir una comunidad biológica) ([Guevara-Carrasco, 1996](#)).

## **2.5. Estudios Genético Moleculares en Merlúcidos**

La distribución geográfica actual del género se extiende a los océanos Atlántico, Indico y Pacífico, en aguas por debajo de los 15°C, salinidad entre 31 a 34.5‰ y distribución batimétrica mayormente entre 80 y 400 m con algunas excepciones ([Minaya, 2001](#)). Aunque la taxonomía del género es compleja, y la designación total del número de especies ha variado, actualmente se reconocen 13 especies con alta conservación de su morfología externa ([Inada et al., 1981](#); [Cohen et al., 1990](#); [LLoris et al., 2003](#)) planteando incertidumbre en sus relaciones filogenéticas, lo cual sugiere la aplicación de técnicas moleculares ([Roldán et al., 1999](#); [Quinteiro et al., 2000](#)). Estos métodos han proveído datos críticos en la solución de problemas similares en otros taxos.

Los estudios genéticos moleculares en merlúcidos han comprendido el uso de distintos marcadores moleculares para determinar relaciones filogenéticas y estructura poblacional. Entre los marcadores empleados se reportan aloenzimas ([Pla et al. 1991](#); [Mangaly y Jamieson 1979](#); [Roldán et al., 1998](#), [Roldán et al., 1999](#), [Hernández et al., 2000](#); [Galleguillos et al., 2000](#); [Iwamoto et al., 2004](#)); microsatélites ([Lundy et al., 1999](#)), [Lundy et al., 2000](#), [Castillo et al., 2005](#), [Renshaw et al., 2010](#)), genes

ribosomales nucleares ([Wiley et al. 2000](#)) y ADNmt ([Oyarzun 1997](#); [Quinteiro et al. 2000](#), [Campo et al., 2007](#)).

[Quinteiro et al \(2000\)](#), reportó el primer patrón de relaciones evolutivas entre 11 especies de merlúcidos usando la secuencia de la región hipervariable izquierda del D-loop mitocondrial, además demostró que la región de control del ADNmt revela similar composición de bases entre distintos Gadiformes.

[Moran et al \(1999\)](#) , es el primero en aislar microsatélites de un merlúcido, los cuales son usados por [Lundy et al \(1999\)](#) para estudiar la estructura poblacional de *M. merluccius*.

## **2.6. Estudios Genéticos Moleculares en *Merluccius gayi*.**

En el Perú se carece de información genética molecular en *Merluccius gayi peruanus*. Sin embargo se tiene diversos estudios sobre tecnología alimentaria y aspectos biológico-pesqueros.

[Oyarzun \(1997\)](#), realizó el primer estudio con el ADN mitocondrial de la merluza chilena empleando enzimas de restricción con lo cual mostró que el más común de los haplotipos tenía frecuencias similares en los dos extremos del rango poblacional de la especie.

[Hernández et al \(2000\)](#), realizó un estudio comparativo entre ambas subespecies. El análisis de polimorfismos de proteínas reveló valores relativamente bajos de heterocigosidad en ambas subespecies de *Merluccius gayi*, mostrando *Merluccius gayi peruanus* niveles de polimorfismo menores (18%) que *Merluccius gayi gayi* (24%).

## **2.7. Historia Biogeográfica de las Merluzas del Pacífico.**

Información paleontológica sugiere que el género *Merluccius* apareció en la mitad del Oligoceno (Fedotov y Bannikow 1989, en [Quinteiro et al. 2000](#)). La calibración de reloj bioquímico para merluzas puede proveer un aproximado del tiempo

de divergencia del género. Para el reloj molecular desarrollado para estudios de peces, la distancia genética de Nei  $D=1.0$  representa 19 millones de años de separación. Así los valores de distancia genética entre el género *Trisopterus* y *Merluccius* ( $D=1.411$ ), el género *Micromesistius* y *Merluccius* ( $D=1.644$ ), indicarían una separación alrededor de unos 26-31 millones de años, que corresponde a la época del Oligoceno.

[Roldan et al. \(1999\)](#), basándose en información geológica y paleontológica, describe que durante esta época Africa colisiona con Eurasia, seguido por la formación del mar de Tethys, que permaneció abierto a peces de aguas poco-profundas hasta casi 20 millones de años. Un considerable número de especies de gádidos aparece en depósitos del Mioceno de Europa Central y del Caucásico que en el Oligoceno, confirmado la presencia de un común antecesor de ambas familias en el mar de Tethys.

Estudios genéticos moleculares basados en polimorfismos de proteínas y en divergencia de secuencia del ADNmt ([Roldán et al 1999](#), [Quinteiro et al. 2000](#)), son concordantes con los resultados de otros estudios morfológicos, biogeográficos, ectoparásitos y otolitos que indican la existencia de dos linajes evolutivos en las merluzas.

Estos linajes evolutivos serían:

- a. Clado o linaje Euro-Africano, formado por las especies *Merluccius capensis*, *Merluccius merluccius*, *Merluccius paradoxus*, *Merluccius polli* y *Merluccius senegalesis*
- b. Clado Americano, formado por *Merluccius productus*, *Merluccius. bilinearis*, *Merluccius australis*, *Merluccius hubsii*, *Merluccius gayi*, *Merluccius angustimanus* y *Merluccius albidus*.

[Roldan et al. \(1999\)](#) comenta que los altos valores de heterozigocidad encontrados en las especies americanas es consistente con grandes tamaños poblacionales durante la especiación, la cual continua hasta el presente. Mientras que

los bajos porcentajes de heterocigosidad de las especies euroAfricanas es consistente con cuellos de botella ocurridos durante o posteriormente a su especiación.

Sobre la aparición de estos linajes evolutivos se plantea la hipótesis de paso del Istmo de Panamá. Un grupo que habitaba en el Atlántico Occidental, se desplazó durante el Oligoceno o comienzos del Mioceno hacia el Pacífico a través de la apertura del Istmo de Panamá. Una vez restablecido el Istmo hace unos 3,5 millones de años, dicho grupo ancestral dio origen hacia el sur a *Merluccius angustimanus*, *Merluccius gayi* y hacia el norte a *Merluccius productus*. Aunque los eventos posteriores que dieron origen a esta especiación permanece desconocidos ([Galleguillos et al. 2000](#)).

## **2.8. Historia Biogeográfica de *Merluccius gayi*.**

Entre ambas subespecies *M. gayi gayi* y *M. gayi peruanus*, [Hernández et al. \(2000\)](#) reporta una elevada identidad genética (0.873). Así mismo los valores de distancia genética obtenidos para estas subespecies, se asemejan a los encontrados en el reconocimiento subespecífico de subespecies en otros taxas. Por otra parte, la existencia de tres loci únicos para *Merluccius gayi peruanus* permite reafirmar su condición subespecífica, concordando con la propuesta original de [Ginsburg \(1954\)](#).

[Hernández et al \(2000\)](#) reporta que el nivel de diferenciación genética encontrado para las subespecies de *M. gayi*, equivale a una separación de entre 900 000 y 2 000 000 de años. Lo que permitiría establecer que la población ancestral, estuvo ligada inicialmente a la plataforma continental del norte del Perú, y plantea la hipótesis que su migración hacia el sur estuvo inicialmente restringida por la Gran Cuenca Peruano-Chilena, evento geográfico formado antes del Mesozoico. Esta barrera geográfica restringiría la plataforma continental, zona a la cual se asocian las especies de merluzas por hábitos alimenticios y reproductivos. Evidencia paleogeográfica indica que durante el Pleistoceno el mar avanzó en áreas de las costas del norte de Chile y el sur de Perú, lo que habría permitido la formación de bahías y la extensión de la plataforma continental. Esto último, habría sido un puente que permitió

la migración hacia las costas de Chile. Estas bahías sólo se han registrado en basamentos pleistocénicos, lo que hace pensar que desaparecieron a finales de esta época reincorporándose la barrera que constituiría el evento vicariante que permitió el origen de *Merluccius gayi gayi* en la subdivisión sur del Pacífico Sur-Este y de *Merluccius gayi peruanus* en la subdivisión Sur Norte del Pacífico Sur-Este.

## **2.9. Estudios Genéticos Moleculares en el Manejo Pesquero**

Los resultados de [Mangaly y Jamieson \(1979\)](#), basado en tres marcadores bioquímicos, fueron consistentes, con la hipótesis de que la merluza europea del norte de la plataforma Atlántica, consistía de una sola “raza” o población. Posteriormente [Roldán et al., \(1998\)](#) en base alozimas apoya la hipótesis sobre la existencia de dos stocks. Uno de ellos en el Atlántico y otro en el Mediterráneo, aislados por el canal de Gibraltar. Esta asunción ha sido principalmente apoyada por datos morfológicos, pero también por preliminares datos genéticos ([Pla et al., 1991](#)) y con microsatélites ([Lundy et al., 1999](#)).

El ICES (International Council for the Exploration of the Seas) asume la existencia de dos stocks de *M. merluccius* en el área Atlántica, uno al norte del paralelo 44°30' y otro al sur con el Cabo del Caños de Breton, como límite geográfico. Pero la existencia de estos dos stocks no tiene una clara evidencia biológica. [Roldán et al., \(1998\)](#) observa una posible subestructuración de la población del norte del Atlántico, entre las muestras de Irlanda y del Mar Cantábrico, sugiriendo una modificación para el manejo de la población Atlántica. [Lundy et al., \(1999\)](#) en base a microsatélites, encuentra evidencia que sugiere una estructura poblacional de mayor complejidad en la región Atlántica, contrariamente a la asumida por el ICES. Planteando que es necesaria una revisión del manejo de la política de la merluza europea.

## 2.10. El ADN mitocondrial como Marcador Genético.

El ADNmt animal es una molécula circular de doble cadena usualmente de 14000 a 26 000 pb, aunque un genoma mitocondrial superior a los 42000 Kb ha sido observado en el molusco *Placopecten magellanicus*. Generalmente en los peces el ADNmt es homoplásico, es decir todas las moléculas son iguales, lo que facilita que el tejido extraído de diferentes tejidos tenga el mismo ADNmt. Aunque en algunos casos se ha reportado heteroplasma de longitud en ADNmt de peces, que muestran la presencia de secuencia de microsatélites (repeticiones de 2pb) en la región D-loop. Este tipo de heteroplasma puede ser utilizada para conocer la estructura poblacional, y es uno de los motivos del secuenciamiento de genomas mitocondriales de peces. La heteroplasma de longitud ha sido reportada en *Perca fluviatilis*, *Gadus morhua*, ([Johansen, 1996](#)).

Los genomas mitocondriales portan genes que codifican 13 proteínas (7 subunidades de la NADH deshidrogenasa, 3 subunidades de la citocromo oxidasa, ATPasa 6, ATPasa 8 y el citocromo b, 22 ARNt (tARNs) y 2 ARNr (12S y 16S), adicionalmente una región de control está presente que contiene el origen de replicación de la cadena ligera (conocida como D-loop en vertebrados). Estudios de secuenciamiento en diversos peces teleósteos han demostrado que muestran el típico orden de los vertebrados ([Billington, 2002](#)).

Tres características del ADNmt animal hacen que sea útil como marcador genético en estudios de sistemática molecular, y en particular, para estudios de genética de poblaciones y estudio de interrelaciones filogenéticas entre especies cercanamente relacionadas:

- a. El ADNmt es heredado maternalmente,
- b. El ADNmt no está sujeto a recombinación.
- c. Alta tasa de mutación.

Las mitocondrias son organelos subcelulares que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas, cuya función principal es la producción de la

energía celular en forma de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés). Una de las particularidades de estos orgánulos es la de poseer un sistema genético propio con toda la maquinaria necesaria para su expresión, es decir, para replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene.

#### **2.10.1. Herencia matrilineal**

Diferentes estudios sugieren que la herencia del ADNmt es predominantemente materna. Siendo en vertebrados predominantemente un tipo de herencia uniparental, principalmente de línea materna. En el caso de los vertebrados, el cigoto posee en su genoma nuclear las líneas materna y paterna, mientras que el genoma mitocondrial es principalmente materno. Es decir toda la progenie hereda el ADNmt materno ([Billington, 2002](#)). Sin embargo algunos casos de herencia biparental han sido reportados en algunos animales (moluscos, insectos y mamíferos) y plantas, incluyendo uno que involucra por primera a un pez, la anchoveta europea, *Engraulis encrasicolus* ([Magoulas y Zouros 1993](#); [Skibinski et al., 1994](#)).

#### **2.10.2. Ausencia de recombinación**

La falta de recombinación en esta molécula, hace posible que esta sea heredada sin la presencia de cambios significativos en pocas generaciones a la progenie. Caso contrario con el ADN nuclear, el cual está sometido a recombinación en el cual se producen diferentes variedades de una región génica, los cuales serán aportados por cada gameto sexual, en cambio solo una variedad de ADN mitocondrial es aportada por un sexo a toda su progenie. Siendo otro resultado de la falta de recombinación el mantenimiento de la conservación del orden como de la secuencia de sus regiones codificantes. ([Billington 2002](#)).

[Eyre-Walker y Awadalla \(2001\)](#), reportan evidencias en favor y en contra de la recombinación en humanos, concluyendo que aunque no está firmemente establecida la ruta por la cual la recombinación puede suceder, y que mientras

alguna evidencia genética poblacional no sugiera recombinación, la falta de recombinación mitocondrial es un carácter del ADN mitocondrial.

### **2.10.3. Elevada tasa de Mutación**

La tasa de mutación del genoma mitocondrial es 10 veces mayor que el genoma nuclear, esto se debe posiblemente a la falta de mecanismos de reparación, ausencia de histonas, y la más frecuente exposición del ADNmt a metabolitos reactivos de oxígeno. Debido a este hecho, la variación de secuencias entre individuos de una misma especie es muy grande, hasta unos 70 nucleótidos ([Ballard y Dean, 2001](#)).

### **2.10.4. Aplicaciones del ADNmt.**

Debido a su herencia materna y relativa alta tasa de evolución del ADNmt en vertebrados, el material genético de esta organela ha sido usado en diversos trabajos que reportan su utilidad como un marcador evolutivo para estudiar los procesos de evolución molecular, diversidad genética, inferir patrones filogeográficos y filogenéticos y determinar la estructura poblacional de diferentes especies de peces ([Lankford, et al. 1999](#); [Stabile et al. 1996](#); [Ward et al., 2001](#); [Maekawa et al. 2001](#); [Ballard & Dean 2001](#); [Sang et al. 1994](#)) o en la contrastación de la sistemática molecular con la taxonomía basada en la morfología ([Flowers y Foltz 2001](#)). [Ballard y Dean \(2001\)](#) sugiere que los arreglos de genomas mitocondriales proveen una herramienta que podría robustecer la reconstrucción filogenética.

Hoy en día se usa marcadores genéticos que evolucionan rápidamente con la expectativa de que provean una mayor sensibilidad para la detección de patrones genéticos. En algunos casos, estudios de ADNmt parecen llevar esta expectativa, revelando diferencias genéticas en una escala geográfica más fina que las reveladas por electroforesis de proteínas. Además de evolucionar



rápidamente, el ADNmt se puede analizar en términos de relaciones genealógicas entre secuencias ([Neigel, 1994](#)).

El ADN mitocondrial es una molécula que presenta una elevada conservación tanto de la secuencia como del orden de sus regiones codificantes, por este motivo se documenta en la bibliografía la existencia de primers universales, los cuales han sido utilizados en diversos estudios de investigación alrededor del genoma mitocondrial, especialmente esto ha facilitado el secuenciamiento completo de una diversidad de genomas en distintos vertebrados. Por ejemplo el primer L11592 ([Bremer et al., 1995](#)) es un primer común a la región del ARN-t Prolina y ha sido utilizado en estudios de *Gadus morhua*, *Xiphias gadius*, *Merluccius gayi* y *Latimeria* sp.

#### **2.11. Técnica de Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP).**

El término SSCP fue inicialmente usado por Hayashi y su grupo para describir el uso intencional de la movilidad dependiente de la secuencia para detectar polimorfismos de ADN in Southern blots ([Yap y McGee, 1994](#))

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en investigaciones biomédicas, realizándose diferentes adaptaciones que han mejorado su sensibilidad. Posteriormente se ha empleado en estudios poblacionales, siendo utilizado por los ecologistas moleculares o genetista de poblaciones principalmente como una herramienta para estimar diferencias genéticas entre individuos o grupos de individuos. En estudios poblacionales, muchas muestras pueden ser secuenciadas, pero muchos individuos pueden llevar la misma secuencia. La técnica de SSCP ofrece un simple, corto y sensitivo método para detectar si algún fragmento de ADN es idéntico en secuencia, y reducir grandemente la cantidad de secuenciamientos necesarios ([Sunnucks et al, 2000](#)).

### **2.11.1. Principios Moleculares de la Técnica**

La denaturación por métodos físicos, químicos o ambos de un fragmento de ADN de hebra doble produce hebras simples de ADN (ADNss). Bajo condiciones electroforéticas apropiadas (generalmente bajas temperaturas y condiciones no denaturantes), la movilidad del ADNss, no es dependiente únicamente de la longitud y peso molecular del fragmento, sino también de su conformación. Pequeños cambios en la secuencia de nucleótidos pueden alterar la conformación del ADNss y consecuentemente su movilidad electroforética. ([Hayashi, 1991](#); [Yap y MacGee, 1994](#); [Gago-Zachart et al., 1999](#)).

[Humphries et al. \(1997\)](#) plantea esta diferencia en la movilidad en términos de carga eléctrica. Aunque pueden existir muchas conformaciones de la molécula que pueden alterar la conformación física o el tamaño de tal manera que una variante en secuencia tenga la misma carga, entonces la relación configuración/carga ó tamaño/carga es diferente lo cual puede ser detectable como una diferencia en la movilidad electroforética en una matriz como lo es la poliacrilamida. Reciente evidencia sugiere que esta diferencia en la movilidad en basada principalmente en la estructura terciaria más que la secundaria en la molécula de ADN ([Sunnucks et al, 2000](#)).

### **2.11.2. Sensibilidad de la técnica.**

Esta técnica ha mostrado ser reproducible, sensitiva, rápida y de bajo costo. La sensibilidad de la técnica es inversamente proporcional al tamaño del fragmento ([Sunnucks et al, 2000](#)), llegando en condiciones ideales la sensibilidad entre 80% - 90% para detectar mutaciones en fragmentos entre 100pb-200pb ([Sheffield et al., 1993](#)). Diferentes autores ([Orita et al.,1989](#); [Hayashi, 1991](#); [Sheffield et al., 1993](#)) han recomendado usar fragmentos entre 100 a 400pb. Aunque [Bastos et al \(2001\)](#) detecto diferencias en fragmentos de

mayor tamaño, 510pb. Por esta razón, en este trabajo, la porción hipervariable fue analizada en diversas subregiones tal como lo recomienda [Gago-Zachart et al.\(1999\)](#) en el caso de trabajar con fragmentos mayores de 400pb.

## **2.12. La Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Esta técnica introducida por Kary Mullis en la década de 1980, es comúnmente empleada en los laboratorios y centros de investigación actuales en el proceso de amplificación de segmentos de ADN de interés empleando como material origen los ácidos nucleicos.

Esta técnica posee dos etapas:

- 1) La preparación de una mezcla de reactivos que dada sus relaciones molares permitirán la amplificación específica del segmento de interés. Esta mezcla está constituida por:
  - a. El agua, la cual brinda el medio acuoso donde se lleva a cabo la reacción.
  - b. El buffer, es la sustancia que permite brinda las condiciones de pH y la estabilidad a la reacción.
  - c. Los dNTPs, vienen a ser los “ladrillos de construcción” del ADN, son las bases nitrogenadas: adenina, citosina, guanina y timina.
  - d. El cloruro de magnesio: Esta sal permite linealizar a la molécula de ADN y sirve como cofactor de activación de la enzima Taq Polimerasa.
  - e. Los cebadores de ADN: vienen a ser pequeños segmentos de ADN entre 18-23pb, que flanquean al segmento de interés, uno de ellos se denomina forward y el otro reverse.
  - f. La Taq Polimerasa, esta enzima obtenida del microorganismo *Thermophilus aquaticus*, es la nanomáquina que llevará a cabo, en las condiciones descritas en las líneas anteriores, el proceso de copia del segmento de interés.

Esta mezcla puede ser variada en concentraciones de sus componentes para obtener una amplificación específica del segmento buscado. En otras palabras,

generalmente una mezcla no necesariamente es la misma para diferentes reacciones, se necesita de un proceso de estandarización para optimizar esta mezcla. También se puede añadir otros elementos no mencionados como formamida ó trehalosa que facilite la amplificación de segmentos problemáticos.

2) Las temperaturas del proceso de amplificación, estas se dividen en tres etapas.

- a. Temperatura de denaturación: esta generalmente es de 94°C – 95°C, su función es lograr separar ambas hebras de ADN y dejar en descubierto las bases nitrogenadas.
- b. Temperatura de hibridización: esta temperatura varía dependiendo de la secuencia de los cebadores, su función es favorecer el emparejamiento complementario de bases entre el cebador y el ADN genómico.
- c. Temperatura de extensión: a esta temperatura la Taq polimerasa inicia la copia teniendo como sitio de inicio el extremo 3' de los cebadores usados.

Se produce la repetición de estas temperaturas varias veces, que corresponde a los ciclos de amplificación. Rutinariamente estos ciclos oscilan entre 30-35. Por ciclo se producen  $2^n$  copias.

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis Nula:** En el mar peruano no existe diferenciación genética significativa entre las distintas zonas de muestreo ubicadas al norte y sur del paralelo 6°S, lo cual caracterizaría a una sola unidad poblacional de *Merluccius gayi peruanus*.

**Hipótesis Alternativa:** Si se evidencia diferencias genéticas entre las poblacionales al norte y sur del paralelo 6°S, entonces la merluza peruana está conformada por dos unidades poblacionales.

#### **Objetivo General:**

- Determinar la presencia de uno o dos unidades poblacionales de merluza peruana por la comparación de secuencias de la región de control del ADN mitocondrial.

#### **Objetivos Específicos:**

- Obtener un protocolo para la purificación del ADN en las muestras fijadas obtenidas por IMARPE.
- Diseñar marcadores genéticos que permitan la obtención de la secuencia de la región de control hipervariable mitocondrial de la merluza peruana.
- Comparar el uso de la técnica de SSCP y la de secuenciamiento para detectar variantes de secuencias en la región de control mitocondrial.
- Aplicar los recursos bioinformáticos pertinentes al estudio de secuencias conservadas para diseñar cebadores de PCR y para la evaluación comparativa de las poblaciones.
- Caracterizar genéticamente la población de merluza peruana por comparación con estos marcadores en individuos de diferente origen ecogeográfico.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Lugar de Ejecución

El estudio se llevó a cabo en dos entidades: Laboratorio de Artes y Métodos de Pesca de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LAB AMP-UNMSM) y el Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres (CGBM-USMP).

En el LAB.AMP-UNMSM, se llevó a cabo la extracción de ADN de las muestras colectadas, y en el CGBM-USMP, se realizó el análisis genético molecular.

### 4.2. Obtención de Material Genético

#### 4.2.1. Estrategia de Colección de Muestreo Biológico.

El modelo poblacional a evaluar es el de aislamiento por distancia, que se basa en que los cruzamientos al azar se hallan limitados por la distancia, por lo que los individuos tendrán mayor probabilidad de aparearse con individuos cercanos que con individuos lejanos. Es así que esta estrategia se elabora bajo la siguiente premisa: *“Entre individuos distantes geográficamente deben evidenciar mayores diferencias génicas debido a la presencia de menor flujo génico”*.

Teniendo en cuenta la distribución latitudinal del recurso en el mar norperuano, se considero puntos geográficos distribuidos latitudinalmente al norte y sur del paralelo 06 (zona reportada como límite entre las dos posibles poblaciones existentes de *Merluccius gayi peruanus*).

El muestreo se coordinó entre el Blgo. Roger Quiroz Bazán, encargado del LAB.AMP-UNMSM y el Dr. Manuel Samamé, especialista en la pesquería de la

merluza. Las colectas fueron realizadas por el Crucero de Investigación BIC 01-09 Humboldt (IMARPE) del 10 al 29 de septiembre de 2001, entre los paralelos 03°S y paralelo 07°S, cuya misión fue la evaluación de la biomasa y dinámica poblacional del recurso merluza a lo largo de todo su rango poblacional durante la primavera del 2001, producto de este crucero se colectaron 50 muestras, distribuidas en seis zonas de muestreo denominados: lance 40, lance 41, lance 43, lance 46, lance 52 y lance 54. Adicionalmente se realizó un muestreo a cargo de la Blga. Roxana, Rodríguez en una embarcación artesanal, en la que se colectaron 10 individuos denominados ART ó ARTESANALES: colectados frente a Paíta (15 de junio 2001) ([Figura T1](#)).

De cada lance de pesca efectuado se seleccionaron individuos aleatoriamente, se registró datos biológicos ([Tabla T1](#)) (longitud total, sexo y estadio sexual) y datos geográficos (latitud, longitud y profundidad de pesca). Se les extrajo el hígado y la gónada, que fueron almacenados en etanol 70% en frascos oscuros, los cuales están mantenidos en el laboratorio a -4 °C, para realizar las extracciones de ácidos nucleicos.

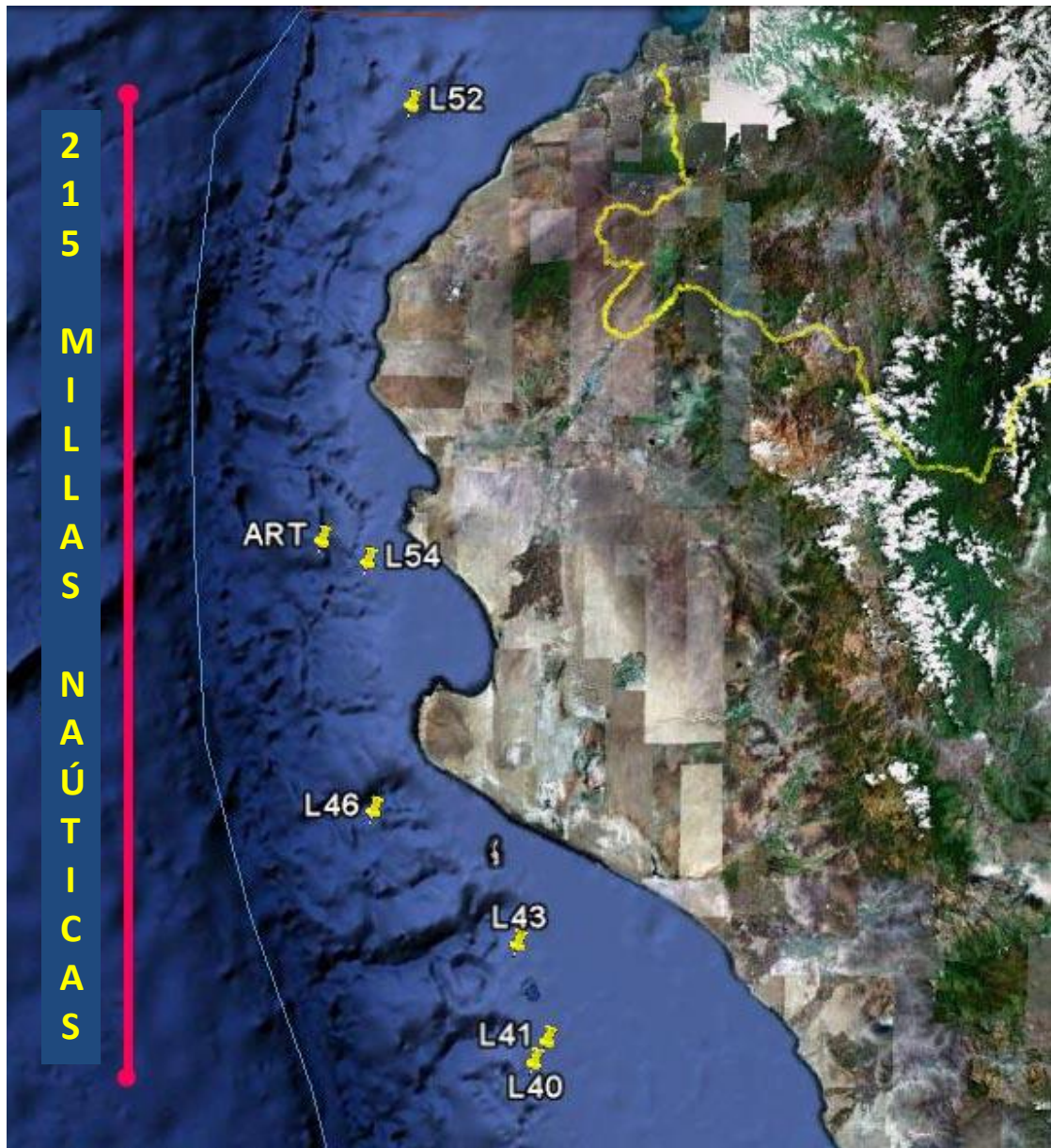


Figura T 1. Lugares de Muestreo de Merluza durante Crucero de Investigación BIC 01-09 Humboldt (IMARPE) del 10 al 29 de septiembre de 2001. La distancia lineal entre los extremos geográficos (L52 y L40) es de 215 millas náuticas (400Km)



**Tabla T 1. Datos biológico – pesqueros y ubicación geográfica del muestreo efectuado a bordo del BIC-HUMBOLDT (10-29 set, 2001) y a bordo de embarcaciones artesanales.**

Muestras		Variables Biológicas –			Fecha	Ubicación Geográfica		
ID	COD	Longitud total (cm)	Sexo (1=hembra)	Estadio sexual	Fecha de colecta	Latitud(S)	Longitud(O)	Profundidad de pesca(m)
01	40-01	13,0	1	1	20/09/01	7° 16.20	80° 42.80	132
02	40-02	14,0	1	2	20/09/01	7° 16.20	80° 42.80	132
03	40-03	15,0	1	2	20/09/01	7° 16.20	80° 42.80	132
04	40-04	17,0	1	2	20/09/01	7° 16.20	80° 42.80	132
05	40-05	15,0	1	2	20/09/01	7° 16.20	80° 42.80	132
06	41-01	16,0	1	2	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
07	41-02	17,0	1	2	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
08	41-03	17,0	1	2	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
09	41-04	18,0	0	2	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
10	41-05	18,0	1	3	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
11	41-06	19,0	0	3	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
12	41-07	27,0	1	4	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
13	41-08	21,0	1	3	20/09/01	7° 11.50	80° 39.80	126
14	43-01	21,5	1	4	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
15	43-02	24,0	1	4	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
16	43-03	23,2	1	7	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
17	43-04	26,0	1	4	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
18	43-05	26,2	1	7	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
19	43-06	25,0	1	4	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
20	43-07	28,0	1	4	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
21	43-08	27,6	1	4	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
22	43-09	30,9	1	4	21/09/01	6° 49.70	80° 46.90	115
23	46-01	24,0	1	3	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
24	46-02	24,0	1	7	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
25	46-03	23,0	1	3	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
26	46-04	24,0	1	3	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
27	46-05	24,0	1	3	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
28	46-06	24,0	1	7	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
29	46-07	23,0	1	7	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
30	46-08	24,0	0	6	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
31	46-09	25,0	1	3	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
32	46-10	29,0	1	4	22/09/01	6° 19.75	81° 19.75	263
33	52-01	30,0	1	4	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
34	52-02	34,0	1	4	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
35	52-03	33,0	1	4	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
36	52-04	33,0	0	4	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
37	52-05	39,0	1	7	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
38	52-06	39,0	1	4	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
39	52-07	42,0	1	8	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
40	52-08	45,0	1	3	24/09/01	3° 39.94	81° 11.80	420
41	54-01	27,0	1	3	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
42	54-02	27,0	1	7	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
43	54-03	28,0	1	3	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
44	54-04	26,0	1	7	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
45	54-05	27,0	1	7	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
46	54-06	26,0	1	7	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
47	54-07	28,0	1	3	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
48	54-08	27,0	1	3	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
49	54-09	26,0	1	3	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
50	54-10	28,0	1	3	26/09/01	5° 23.13	81° 21.66	257
51	ART01	26,0	1	4	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
52	ART02	28,0	1	3	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
53	ART03	30,0	1	4	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
54	ART04	25,0	1	3	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
55	ART05	26,0	1	2	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
56	ART06	29,0	1	4	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
57	ART07	41,0	0	4	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
58	ART08	30,0	1	7	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
59	ART09	29,0	1	7	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078
60	ART10	38,0	1	6	10/06/01	5° 18.23	81° 31.45	078

#### **4.2.2. Extracción de ADN de las Muestras Colectadas.**

La extracción se llevó a cabo en el LAB. AMP-UNMSM, siguiendo el siguiente protocolo, que es resultado de una modificación del protocolo de obtención de ADN a partir de sangre periférica usado de rutina en el CGBM-USMP. Las principales modificaciones incluyen el trozado de las muestras en partículas finas al tratarse de tejido hepático y gonadal, el paso de hidratación de las muestras y el aumento de concentración de proteinasa K. A continuación el protocolo en detalle:

**Hidratación de las muestras.** Esta etapa es necesaria para retirar el alcohol de la muestra, el cual puede actuar como inhibidor de las reacciones subsiguientes. Mientras más fina sea la partícula es mejor la eficiencia de la hidratación.

- a. Se extrajo con ayuda de pinzas y bisturí un sector de hígado (cubo de 0.5cm). Aproximadamente de un volumen de 50ul. El trozo se corto y trituró con ayuda de la pinza.
- b. Se hidrato la muestra en solución TE 20:5 en un tubo Falcon de 15mL, con 15mL de solución por 20 minutos.

La muestra se halla deshidratada por la conservación en etanol, para los pasos de lisis subsiguientes es necesario eliminar el etanol y que las estructuras celulares se hidraten para facilitar el siguiente paso.

**Lavado de las muestras.** En esta etapa se quiere eliminar las sustancias contaminantes que posee el tejido y que pueden afectar a posteriori las reacciones de los estudios genéticos.

- c. Se mezcló con ayuda del vortex (Genie 2, Scientific American), y se llevó a una centrifuga Heraeus a 3500rpm por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante.

- d. Al pellet se le tritura con ayuda de una baqueta y este se mezcla fuertemente con el vortex.
- e. Se repite 3 a 4 veces desde el paso c, hasta que el sobrenadante quede transparente. Una vez terminado esto se pasa al siguiente paso.

Con estos lavados se trata de eliminar impurezas como toxinas ó metabolitos propios del tejido, en especial si se trata del hígado ya que este órgano tiene una función depuradora y bioacumula sustancias.

***Lisis de Membranas y Proteínas.*** En esta etapa se lisa químicamente las células dejando libre en el medio acuoso a los ácidos nucleicos en especial al ADN.

- f. Al pellet se le agrega 2mL de TE 20:5. Mezclar vigorosamente.
- g. Se agrega 180uL de N-Lauryl Sarcosyl (Sigma) al 10%. Se agrega 5uL de proteinasa K (Promega) (20mg/ml).
- h. Se deja a 54°C por 24 horas en movimiento rotatorio en una incubadora GFL modelo 7601.

***Precipitación y Purificación de Ácidos Nucleicos.*** El ADN en solución se halla acompañados de otras sustancias que pueden actuar negativamente en reacciones posteriores. En esta etapa se precipitan de manera diferencial de proteínas usando una precipitación con acetato de amonio y otra de cloruro de sodio. Así mismo junto con una solución de etanol 70% se logra una purificación del ADN. Hay que tener en cuenta que en cada paso de precipitación y purificación se pierde ADN genómico. Por lo que hay que trabajarlo con precaución y sin excederse de los tiempos.

- i. Se agrega acetato de amonio (Merck) a una concentración final de 2,5M.

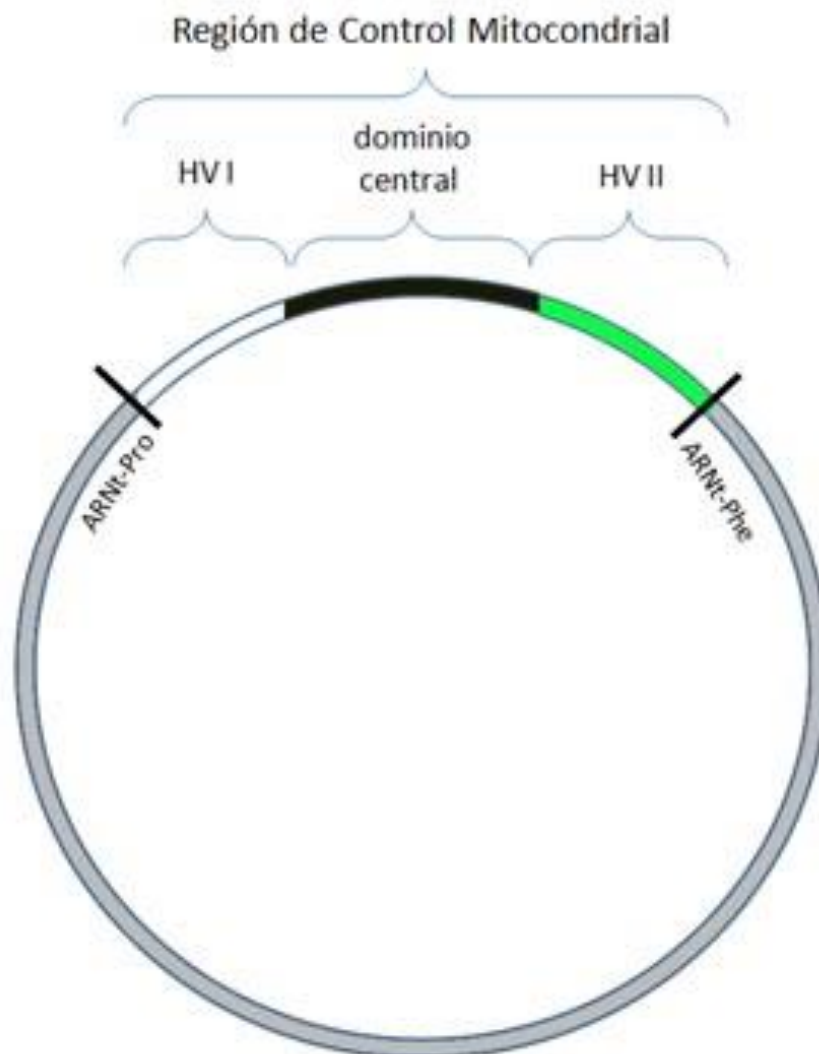
- j. Se añade 2 ½ volúmenes de etanol absoluto (Merck) frío. Se deja en frío hasta observar el precipitado. Se puede guardar los tubos en una cubeta con hielo.
- k. Una vez observado el precipitado, si este se puede capturar con una pinza, se deseca y se pasa al paso (n). En caso contrario continuar con (l).
- l. En una microcentrífuga Heraeus para tubos de 1.5ml usar 3800rpm por 20 minutos.
- m. Eliminar el sobrenadante.
- n. Resuspender el pellet en 500uL de alcohol etanol al 70% frio (rebajado con TE 20:5), por 10 minutos.
- o. Secar el precipitado a temperatura ambiente.
- p. Resuspender en 500ul de TE 20:5 y añadir cloruro de sodio (Merck) 0.25N, mezclar suavemente.
- q. Añadir 1.5ml de etanol absoluto frío, invertir el tubo para obtener un precipitado.
- r. Secar el precipitado a temperatura ambiente.
- s. Resuspender el precipitado en 400ul de TE 20:1 y traspasar a tubos eppendorf estériles de 1.5ml (Axygen).
- t. Almacenar los tubos con la solución de ADN a 4°C.

#### 4.3. Empleo de marcadores genéticos mitocondriales.

##### 4.3.1. Estrategia de Selección de Cebadores de PCR.

El marcador genético es la región de control mitocondrial. Los cebadores usados en el presente estudio se agrupan en:

- a. **Cebadores HVI:** Se usarán para evaluar la diversidad genética en el dominio HVI.
- b. **Cebadores DLOOP:** Se usarán para evaluar la diversidad genética en la totalidad de la región de control mitocondrial.



**Figura T 2.** Esquema de la región de control mitocondrial, se indica los tres dominios: el dominio hipervariable izquierdo o HVI, el dominio central y el dominio hipervariable derecho o HV II.

Los criterios usados para la construcción de las secuencias del cebador fueron:

- a. **Criterios generales:** los cebadores deben tener una longitud aproximada de 18pb – 23pb, que no incluya motivos repetidos ó palíndromos, con 30-50% de %GC y por lo menos la mitad 3' del cebador debe tener un alto grado de conservación dentro del taxa.
- b. **Criterio de conservación:** A mayor cercanía taxonómica menor variación entre las especies. Información previa de estudios comparativos orientaron la elección de las secuencias a usar. Por ejemplo para el diseño de cebadores HVI, se tiene en cuenta las relaciones evolutivas de los merlúcidos según isoenzimas ([Roldan et al 1998](#)) y secuencias ADNmt ([Quinteiro et al 2000](#)). Se muestra que las merluzas del Pacífico sur (*Merluccius gayi*, *Merluccius hubssi* y *Merluccius productus*) están genéticamente más emparentadas, por lo tanto los fragmentos conservados serán elegidos para las secuencias de los cebadores.
- c. **Criterio de ubicación y tamaño del amplicon:** Asumimos que las regiones menos conservadas entre las distintas especies serán más variables dentro de cada especie. Los cebadores se deben corresponder a las regiones conservadas y deben flanquear regiones variables. Se considera cebadores externos y un par de cebadores internos de preferencia complementarios entre sí. Para la técnica de SSCP se estima amplicones entre 100pb – 300pb. Para la obtención de toda la región de control cuya longitud aproximada en 800pb en fragmento debe tener esta cantidad como mínima y como máxima 1200pb.

#### 4.3.2. Cebadores HVI.

La amplificación completa del dominio hipervariable izquierdo de la región D-loop se realizó con los cebadores empleados por [Quinteiro et al. \(2000\)](#), L11598 ([Bremer et al., 1995](#)) complementario al ARNt-Pro y el primer B, complementario a la región central del D-loop de los gádidos, que amplifican un fragmento de 480pb. Además se usaron los cebadores: MERFPD1 y GADPRD1 ([Quinteiro et al. 2001](#)), que amplifican un fragmento de 200pb interno al dominio HVI ([Tabla T2](#)).

**Tabla T 2.** Cebadores HVI de merlúcidos empleados en el presente estudio.

Cebador de ADNmt	Secuencias del Cebador	Referencia
<b>L15998</b>	5´ - TAC CCC AAA CTC CCA AAG CTA - 3´	<a href="#">Bremer et al., 1995</a> ; <a href="#">Quinteiro et al., 2000</a>
<b>primer B</b>	5´- ACG CTG GAA AGA ACG CCC GGC ATG G - 3´	<a href="#">Quinteiro et al., 2000</a>
<b>MERFPD1</b>	5´- TCA ACC CAT AAT ACW CAT TCC - 3´	<a href="#">Quinteiro et al., 2001</a>
<b>GADPRD1</b>	5´- ATG GAC CTG AAG CTA GGC A - 3´	<a href="#">Quinteiro et al., 2001</a>

Adicionalmente a los cebadores HVI reportados, es necesario el uso de otros que permitan obtener fragmentos entre 100-300pb, que puedan ser analizados por la técnica de SSCP, debido a que estos tamaños ofrecen una alta sensibilidad en la detección de variantes con esta técnica, por tal motivo se diseñaron un nuevo grupo de cebadores.

[Quinteiro et al \(2000\)](#) usando los primers L11592 y primerB, reporta las secuencias de las HVI de las siguientes especies de merlúcidos: *Merluccius bilinearis* (AF112245), *Merluccius australis* (AF112246), *Merluccius productus* (AF112247), *Merluccius albidus* (AF112248), *Merluccius gayi* (AF112249),

*Merluccius hubbsi* (AF112250), *Merluccius capensis* (AF112251), *Merluccius senegalensis* (AF112252), *Merluccius merluccius* (AF112253), *Merluccius polli* (AF112254) y *Merluccius paradoxus* (AF112255). Se obtuvo en formato \*.gb de la base de datos del NCBI (National Center Biotechnology Institute) estas secuencias para procesarlas y diseñar los primers internos.

Las secuencias fueron alineadas manualmente usando una plantilla de Microsoft Word con tipo de fuente Courier, insertando gaps o indels entre las bases. Se colocó *Merluccius gayi*, *Merluccius hubbsi* y *Merluccius productus* como primeros en la fila, ya que es el grupo más emparentado. La selección de los cebadores se realizó de forma manual ([Figura T2](#)).

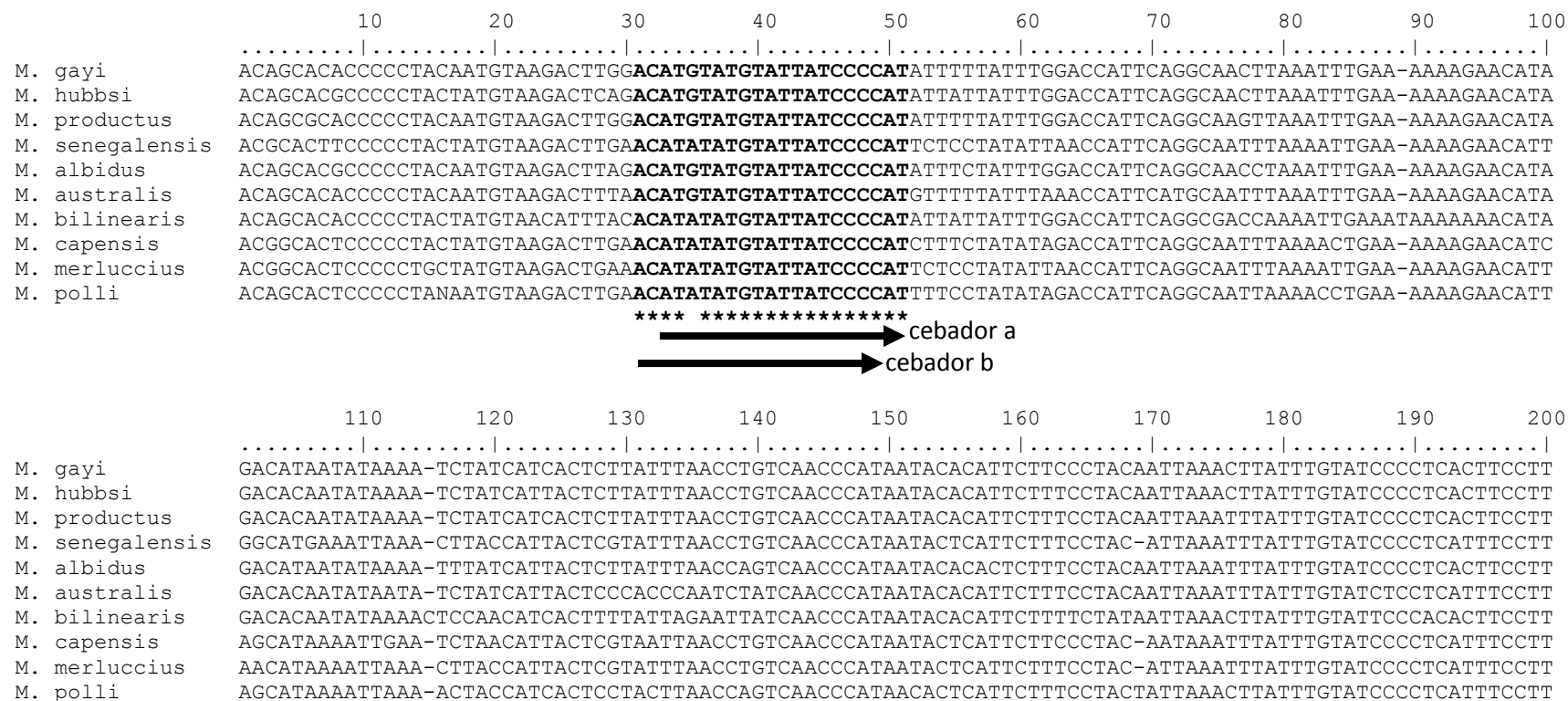
#### **4.3.3. Cebadores DLOOP.**

La región de control de los vertebrados se halla en el siguiente orden:

5'- ARNt-Pro - **Región de Control** - ARNt-Phe - ADN<sub>r</sub> 12S- 3'

El cebador L15998 ([Bremer et al., 1995](#)), se complementa con el ARNt-Pro, entonces para amplificar la región D-loop completa se debe usar las secuencias del ARNt-Phe y/o ADN<sub>r</sub>12S. Se alineo las secuencias de varios gádidos y de algunos cupleidos, usando la herramienta CLUSTAL W, del software Bioedit, las secuencias utilizadas fueron las siguientes: *Artctogadus glacialis* (AM919429), *Gadus morthua* (X99772), *Clupea harengus* (AP009133), *Engraulis encrapsicolus* (AP009137), *Engraulis japonica* (AB040676), *Sardinops melanostictus* (AB032554), *Theragra chalcogramma* (AB094061), *Theragra finnmarchica* (AM489718), *Trachurus trachurus* (AB108498). Las propuestas de primer fueron evaluadas usando la herramienta NETPRIMER (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>), para observar la existencia de hairpirinas, dimeros, secuencias palindrómicas y secuencias repetidas. En la [figura T3](#), se muestra el alineamiento y la ubicación del cebador propuesto en el presente estudio, HARN12S (5'- GGG CTG GCA CGA GTT TTA CCG-3').





**Figura T 3. Alineamientos de las secuencias AF112245 a AF112255 de la región hipervariable izquierda del D-loop mitocondrial de los merlúcidos. En letra negra se indica la secuencia de los primers y con las flechas la ubicación de estos.**

(Continuación)

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
M. gayi	TCTCCAAAGACCCTAATTAAATCACCCGCTAGACTTGCTTACGAAGATACACAGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTAATTGAAGACTCACCCTCAGTG									
M. hubbsi	TCCTCAAAGACCCTAATTAAATCACCCGCTAGACTTGCTTACGAAGATACACAGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTGATTGAAGATTACCCGCTCAGTG									
M. productus	TCCCTAAAGACCCTAATTAAATCACCCGCTAGACTTGCTTACGAAGATACACAGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTAATTGAAGACTCACCCTCAGTG									
M. senegalensis	TCCCCAAATACCCTAATTAAATCACCCGCTAGACTTGCTTACTAAGGTACACGTCTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTACTCGAAGACTCACCCTCAGTG									
M. albidus	TCCCCAAAACCCTAATTAAATCACCCGCTAGACTTGCTTACCAAGGTACAGAGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTAATTGAAGACTCACCCTCAGTG									
M. australis	TCCCTAAGACCCTAATTAAATCACCCGCTAACTTGCTTACCAAAATACACAGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTAATTGAAGATTACCCGCTCAGTG									
M. bilinearis	TCTCCAAAGACTTTAATTAAATCAACCGCTAGACTTGCTTACGAAGATACACGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTAATTGAAGACTCACCCTCAGTG									
M. capensis	TCCCCAAATACCCTAATTAAATCACCCCTAGACTTGCTTACCAAGATACACGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTACTCGAAGACTCACCCTCAGTG									
M. merluccius	TCCCCAAATACCCTAATTAAATCACCCGCTAGACTTGCTTACTAAGATACACGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTACTCGAAGACTCACCCTCAGTG									
M. polli	TCCCCAAATACCCTAATTAAATCACCCGCTAGACTTGCTTACCAAGATGCACGTTCAGTGTAAAGGTCAAGGGTACTAATCGAAGACTCACCCTCAGTG									

\*\*\*  
cebador d ←

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
M. gayi	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAGAGATCTTACAGCTCATAACTAGCATTTTTGCACATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. hubbsi	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAGAGATCTTACAGCTCACAACCTAGCATTTTTGCACATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. productus	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAGAGATCTTACAGCTCATAACTAGCATTTTTGCACATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. senegalensis	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAAACGTCTAACAGCTCACAACCTTGCACTTTTTGTCCATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. albidus	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAGAGATCTTATAACTCACAACCTAGCATTTTTGCACATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. australis	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAGAGATCTTATAACTCAAACTAGCATTTTTGCACATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. bilinearis	AATTATTCCTGGCATCAGTGCCTAGCTTCAGGTCCATAAACATCTTACAGCTCATAACTAGCATTTTTGTACATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. capensis	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAAACGTCTAACAGCTCACAACCTTGCACTTTTTGTCCATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. merluccius	AATTATTCCTGGCATCCCTGCCTAGCTTCAGGTCCATAAACGTCTAACAGCTCACAACCTTGCACTTTTTGTCCATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									
M. polli	AATTATTCCTGGCATCAGTGCCTAGCTTCAGGTCCATAAACATCTTACAGCTCACAACCTTGCACTTTTTGTCCATCTCTTAATGTTGGCAGTCATATATTC									

\*\*\*\*\*  
cebador c →

cebador e \*\*\*  
cebador f ← \*\*\*\*\*

	410
M. gayi	AAATTTCTCA
M. hubbsi	AAATTTCTCA
M. productus	AAATTTCTCA
M. senegalensis	AAATTTCTCA
M. albidus	AAATTTCTCA
M. australis	AAATTTCCCA
M. bilinearis	AAATTTCTCA
M. capensis	AAATTTCTCA
M. merluccius	AAATTTCTCA
M. polli	AAATTTCCCA

\*\*\*\*\*  
—

#### **4.3.4. Detección de Numts.**

Se comparo el tamaño de los productos de PCR obtenidos usando como templado los amplicones de la región de control (mediante PCR anidado) y el ADN genómico. Si los fragmentos obtenidos a partir de ADN genómico eran los mismos que los obtenidos por PCR anidado, eso daría indicios preliminares de que se trataría de ADNmt y no de artefactos de origen nuclear.

Además se verificó en el secuenciamiento un solo nucleótido por posición, que es característico de genomas haploides como el ADNmt. Finalmente se comparó el porcentaje de sitios variables con el de otros merlúcidos, a fin de comparar su variabilidad.

#### **4.4. Optimización de las Reacciones de Amplificación por PCR.**

Las reacciones de PCR fueron estandarizadas modificando las concentraciones de cloruro de magnesio, de primers, dNTPs y modificando las temperaturas de hibridación y tiempos del programa de amplificación.

El volumen de reacción de PCR general para las pruebas fue de 25ul con buffer PCR 1X, x mM de  $MgCl_2$ , 200uM de cada dNTPs, 10pmol de cada primer y 2U de Taq polimerasa. El programa de reacción consiste de una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, de una extensión final de 72°C por 10 minutos. Este fue un protocolo inicial de bajas condiciones de astringencia, con gradiente de concentraciones de  $MgCl_2$  que variaba en  $x = \{1mM, 1,5mM, 2mM\}$ . Y se aumentaba secuencialmente la temperatura de hibridación de 45°C, 50°C, 55°C y 60°C, para aumentar las condiciones de especificidad del PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo tanto usando como ADN molde, tanto al ADN genómico y reacciones de PCR anidado con el fragmento de la región HVI.

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en solución TBE 1X a 100V durante 1 hora. Se cargo 10ul de producto de PCR con 1ul de solución loading buffer de azul de bromofenol (para 100ml, 150mg de azul de bromofenol, 5ml de TBE10X, 150mg de xilene cyanol, 200mg de orange, 60g de Giemsa, completar con agua destilada) y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (50mg/lt) durante 20 minutos y se observaron en un transiluminador UVP siendo registradas fotográficamente.

#### **4.5. Evaluación de técnicas que permitan la detección de mutaciones (polimorfismos de longitud y polimorfismos de secuencia).**

##### ***4.5.1. Búsqueda de Polimorfismos de Longitud.***

Esta técnica se usó para detectar polimorfismos de tamaño en los amplicones obtenidos de la combinación de primers seleccionadas. Consistió en que 5ul de producto de PCR fue mezclado con 5ul de buffer de carga (90% formamida, 0,1% de azul de bromofenol y TBE 1X), esta fue denaturada a 95°C por 15 minutos. Previamente se lavó vidrios de 20cm x 20cm con detergente neutro, agua corriente, agua destilada y finalmente con alcohol etanol 70%. Se prepararon los vidrios para verter 40ml de la solución de poliacrilamida al 6% denaturante (11ml de poliacrilamida al 21%, 4ml de TBE1X, 48g de Urea Grado biología molecular, agua destilada) catalizada con 150ul de persulfato de amonio y 60ul TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina). Después de la polimerización se llevó a cabo una precorrida a 600V por 15 minutos con una placa metálica para la dispersión y homogenización del calor, al finalizar se cargó los 10ul del producto de PCR tratado, limpiando con una pipeta pasteur plástica la solución de urea precipitada en cada pozo.

	----- ARNr - Phe ----- -----ARNr 12S-----										
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....										
	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100										
Arcto	GCTATCGTAG	CTTAA-TTAA	AGTTTAATAC	TGAAGATATT	AGGATGGGCC	CTAGAAA-GT	CCCGAAAGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTGACTT	TACTATCAAT	
Gadus	GCTATCGTAG	TTTAA-TTAA	AGTTTAATAC	TGAAGATATT	AGGATGGGCC	CTAGAAA-GT	CCCGAAAGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTGACTT	TACTATCAAT	
Clupe	GCTAGTGTAG	CTTAAA-CAA	AGCATAACCT	TGAAGATGTT	AAGACGAGCC	CTAGGAAAGC	TCCACAAGCA	CAAAAGTTTG	GTCCTGGCTT	TAATATCAGC	
Engra	GCTCACGTAG	CTTAAATCAA	AGCATAGCAC	TGAAGATGCT	AAGATGAACC	CTGAAAA-GT	TCCGTAAGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTAGCCT	TACTATCAGC	
Engra	GCTCACGTAG	CTTAAATCAA	AGCATAGCAC	TGAAGATGCT	AAGATGAACC	CTGAAAA-GT	TCCGTAAGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTAGCCT	TACTATCAGC	
Sardi	GCTAGTGTAG	CTTAAATCAA	AGCATAACAC	TGAAGATGTT	AAGATGGGCC	GTAAGAA-GC	CCCACGGGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTGACTT	TACTATCAGC	
Thera	GCTATCGTAG	CTTAA-TTAA	AGTTTAATAC	TGAAGATATT	AGGATGGGCC	CTAGAAA-GT	CCCGAAAGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTGACTT	TACTATCAAT	
Thera	GCTATCGTAG	CTTAA-TTAA	AGTTTAATAC	TGAAGATATT	AGGATGGGCC	CTAGAAA-GT	CCCGAAAGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTGACTT	TACTATCAAT	
Trach	GCTAGCGTAG	CTTAA-TTAA	AGCATAACAC	TGAAGATGTT	AAGATGGGCC	CTAGAAA-GC	CCCGCAAGCA	CAAAGGTTTG	GTCCTGACTT	TACTGTCAGC	
Clust	***	****	*****	**	**	**	*****	*	*	*	*

	-----ARNr 12S-----										
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....										
	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400										
Arcto	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGGCCCA	AATTGATGAA	AAACGGCGTA	AAGCGTGGTT	AAGAAAAAAA	GAGAAAATAC	
Gadus	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGGCCCA	AATTGATGAA	AAACGGCGTA	AAGCGTGGTT	AAGNAAAAAA	GAGAAAATAT	
Clupe	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGACCCT	AGTTGATATA	-TTCGGCGTA	AAGAGTGGTT	ATGGA AAAACA	AGCA-C-TAA	
Engra	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGACCCT	AGTTGATTGA	-AGCGGCGTA	AAGAGTGGTT	ATGGAATTTT	TTACCC-TAA	
Engra	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGACCCT	AGTTGATTGA	-AGCGGCGTA	AAGAGTGGTT	ATGGAATTTT	CTACCC-TAA	
Sardi	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGGGACCCT	AGTTGATTGA	-ATCGGCGTA	AAGAGTGGTT	ATGGAGAATA	AGAAAC-TAA	
Thera	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGGCCCA	AATTGATGAA	AAACGGCGTA	AAGCGTGGTT	AAGAAAAAAA	GAGAAAATAT	
Thera	AGAGGGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGGCCCA	AATTGATGAA	AAACGGCGTA	AAGCGTGGTT	AAGAAAAAAA	GAGAAAATAT	
Trach	AGAGAGCCCG	TAAAACTCGT	GCCAGCCACC	GCGGTTATAC	GAGAGGCTCA	AGTTGACAGA	CAACGGCGTA	AAGAGTGGTT	AAGGAAAACA	TTCAAC-TAA	
Clust	****	*****	*****	*****	*****	***	*	*	*	*	*

HARN12

**Figura T 4 Ubicación del Primer HARN12, desarrollado en el presente estudio para poder amplificar la totalidad de la región de control de la merluza.**

La electroforesis se realizó a 600V con un tiempo dependiente del tamaño de fragmento a analizar. La tinción se realizó con 400ml de alcohol etanol al 10% por 20 minutos con agitación continua, posteriormente se eliminó el alcohol y se agregó ácido nítrico al 1.5% por 5 minutos, el cual se eliminó, rehidratándose el gel con agua bidestilada por 20 minutos, se vertió una solución de 500ml de nitrato de plata (0,5g de nitrato de plata, 600ul de formaldehído al 37%), se agitó suavemente en forma constante, se retiró la solución de nitrato de la plata y se lava el gel con agua bidestilada por breves segundos la cual se elimina, finalmente se agrega 400ml de la solución reveladora (5g de hidróxido de sodio, 10ul de tiosulfato de sodio 10%, 600ul de formaldehído al 37%). Una vez observado las bandas se detuvo la coloración con 400ml de una solución de ácido acético al 10%. El gel fue fotografiado para su registro.

***4.5.2. Búsqueda de Polimorfismos de Secuencia (método indirecto) mediante la Técnica de SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism).***

2ul del producto de PCR fue mezclado con 2ul del buffer para SSCP (90% formamida, 0,1% de hidróxido de sodio, 0.1% de azul de bromofenol y TBE 1X), esta fue denaturada a 95°C por 15 minutos, después de lo cual fue pasada a hielo, previamente a su carga en un gel de poliacrilamida (stock 24%, 1:41) a concentraciones de 8% y 10% de grosor de 0,2mm con dimensiones de 20cm x 20cm y 20cm x 40cm, con TBE 1X y con presencia / ausencia de glicerol al 10% ([Tabla T4](#)). Se realizó una precorrida previa de 15 minutos a 400V. La electroforesis se llevó a cabo con 200V (20cm x 20cm) y 400V (20cm x 40cm) por un tiempo de 16 horas.

**Tabla T 3. Combinaciones Experimentales de SSCP en lo que se varió el porcentaje de poliacrilamida, la presencia/ausencia de glicerol, con la longitud de la corrida.**

8%	CON 10 % GLICEROL	20cm x 20cm 200 V
	SIN GLICEROL	20cm x 40cm 400 V
10%	CON 10% GLICEROL	20cm x 20cm 200 V
	SIN GLICEROL	20cm x 40cm 400 V

La tinción del gel se llevó a cabo con la técnica de nitrato de plata. El gel no fue pegado a los vidrios y fue teñido en bandejas de plástico con ayuda de láminas de mica. Se agregó 400ml de alcohol etanol al 10% por 20 minutos con agitación continua, posteriormente se eliminó el alcohol y se agregó ácido nítrico al 5% por 5 minutos, el cual se eliminó, rehidratándose el gel con agua bidestilada por 20 minutos, se vertió una solución de 500ml de nitrato de plata (0,5g de nitrato de plata, 600ul de formaldehído al 30%), se agitó suavemente en forma constante, finalmente una vez retirado el nitrato de plata se agregó 400ml de la solución reveladora (5 g de hidróxido de sodio, 10 ul de tiosulfato de sodio 10%, 300ul de formaldehído al 37%). Al observarse las bandas se detuvo la coloración con 400ml de una solución de ácido acético al 10%. El gel fue fotografiado para su registro.

#### **4.6. Análisis de Variantes de Longitud y de Secuencia por SSCP.**

Las variantes de longitud (detectadas en geles de poliacrilamida en condición denaturante) y las de secuencia (detectadas mediante SSCP) fueron catalogadas escribiendo la letra "V" seguida de un ordinal (1, 2, 3, etc) para posteriormente indicar la combinación de cebadores usado (p.e. V1MG, V2MG para las variantes obtenidas con el uso de los cebadores MERFPD1 y GADPRD1). Se armó una tabla de frecuencias para cada tipo de variantes, en la que se indicó la frecuencia de variantes

detectadas entre las poblaciones estudiadas, con esta se llevó a cabo las pruebas estadísticas.

En la evaluación estadística de las variantes encontradas se consideró la hipótesis nula de que la población se halla homogéneamente distribuida, para lo cual se realizó la prueba de homogeneidad  $X^2$ . Así mismo para evaluar que las variantes encontradas no guardan relación con el área geográfica, se efectuó la prueba de independencia de  $X^2$ . En ambos caso se aplicó la corrección de Yates, debido a que las frecuencias de algunas variantes en la muestras era cero.

#### **4.7. Análisis Bioinformático de las Secuencias de la Región de Control.**

Las secuencias de ADN de la región de control mitocondrial completa fueron revisadas manualmente tanto en dirección forward y reverse. Después de esta revisión se alinearon las secuencias usando la herramienta CLUSTAL W ([Thompson et al., 1994](#)) del programa BIOEDIT versión 7.0.9.0 (06/27/07) ([Hall, 1999](#)). Se uso las secuencias del ARNt-Pro, ARNt-Phe y del ADNr12S de *Gadus morhua* (GenBank NCBI X99772) para seleccionar las bases que no pertenecen a la región de control, paralelamente se alinee la secuencia obtenida con la región de control completa de *Merluccius merluccius*. Una vez identificada la región de control completa de la merluza peruana esta fue guardada en un archivo con formato FASTA. El archivo fue ingresado al programa DNAsp 4.50.3 ([Rozas et al., 2003](#)) y se obtuvo el formato \*.MEG para realizar los análisis filogenéticos y de evolución molecular en el programa MEGA versión 4.0 ([Tamura, Dudley, Nei y Kumar, 2007](#)).

##### **4.7.1. Análisis de Diferenciación y Estructura Poblacional.**

Para los siguientes análisis poblacionales se considero la siguiente jerarquización del muestreo. Las secuencias fueron agrupadas por lances (ART, L40, L41, L43, L46, L52 y L54) y por grupos norte (ART, L52, L54), centro (L43,L46) y sur (L40 y L41).



Se efectuó el test exacto de diferenciación poblacional ([Raymond y Rousset, 1995](#)), cuya hipótesis nula es la distribución aleatoria de los haplotipos entre cada par de poblaciones, usando el programa Arlequin 3.1 ([Excoffier et al 2005](#)), considerando 100 000 pasos de la cadena de Markov, con 10 000 pasos de dememorización y con un nivel de significancia de 0.05. Este test se realizó en dos jerarquías poblacionales: entre lances y entre grupos.

Entre las poblaciones que no mostraron diferenciación genética, se evaluó si existían diferencias significativas entre sus valores de diversidad nucleotídica mediante ANOVA (VassarStats: Website for Statistical Computation, <http://faculty.vassar.edu/lowry//anova1u.html>).

La estructura genética de la población se testeó empleando el análisis de varianza molecular (AMOVA) ([Excoffier et al., 1992](#)), implementado en Arlequin 3.1 con 10 000 permutaciones, que se basa en el número de diferencias entre pares de haplotipos como una medida de distancia genética. Este da como resultado valores-F ( $F_{ST}$ ,  $F_{SC}$  y  $F_{CT}$ ), que representan las fracciones de la variación genética entre grupos de merluza a diferentes escalas geográficas, así como la variación molecular entre cada jerarquía. Este análisis se efectuó teniendo en cuenta las siguientes jerárquias: entre lances y entre grupos norte y sur (los cuales poseen la máxima separación de 215 millas náuticas (400Km) ([figura T1](#)).

Las distancias geográficas entre las localidades se determinaron por el ploteo de sus ubicaciones y cálculo de la distancia en Km en Google Earth. Con estos datos se evaluó el modelo de aislamiento por distancia, calculando las distancias  $F_{ST}$ , ignorando los gaps y considerando unas 10 000 permutaciones en el test de Mantel implementado en el servidor Isolation by Distance Web Service, versión 3.16 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>) ([Jensen et al., 2005](#)).

Se emplearon estadísticos (Z y  $S_{nn}$ ) que evalúan la hipótesis nula de falta de diferenciación genética poblacional, basándose en comparación de secuencias

y no la de haplotipos como lo han tratado los test anteriores. Ninguno de estos estadísticos de diferenciación poblacional tiene la premisa del tiempo de colección de las muestras por lo que pueden emplearse con muestras que posean diferentes intervalos de tiempo, como es el caso del lance ART que tienen una temporalidad distinta a los lances L40, L41, L43, L46, L54 y L52. El estadístico  $Z$  ([Hudson e al., 1992](#)), rechaza la hipótesis nula si es significativamente pequeño. El estadístico  $S_{nn}$  ([Hudson, 2000](#)), tiene un mayor poder estadístico que otros test de diferenciación genética en especial si el tamaño de muestra es pequeño y la diversidad haplotípica es alta, es una medida de cuan frecuente secuencias de individuos cercanos a una localidad, pertenecen a la misma localidad. Valores de  $S_{nn}$  cercanos a 1, indican que dos localidades son altamente diferenciadas, pero valores menores a 0.5 indican que ambas localidades son parte de la misma población. Se calculó el índice de estructura poblacional  $G_{st}$  ([Nei, 1973](#)). El cálculo de estos estadísticos se realizó con 10 000 permutaciones, según el programa DNAsp 4.50.3, teniendo en cuenta tres criterios para detectar homogeneidad entre (a) las seis localidades, (b) entre los grupos norte, centro, sur y (c) entre cada grupo. Así mismo se calculó la tasa de migrantes por generación ( $N_m$ ), que es una medida del flujo génico según [Nei \(1973\)](#).

#### **4.7.2. Análisis Filogenético y Haplotípico.**

Se analizó las relaciones filogenéticas entre las secuencias de la región de control con la construcción de un árbol neighbor-joining con el método de mínima evolución, con 10 000 bootstrap, eliminando completamente los gaps, las distancias se calcularon usando el método de Maximum Composite Likelihood, teniendo como unidades el número de sustituciones de bases por sitio, según se halla implementado en el programa MEGA 4.0.

Se construyó una red de haplotipos (Minimum Spaning Network, MSN) con el programa TCS 1.21 ([Clement et al., 2000](#)), en la cual el área de cada haplotipo esta en relación con su frecuencia poblacional. Este programa usa el formato de salida PHYLIPS del programa DNAsp 4.50.3, para lo cual se consideró dos formas de construcción de los haplotipos: eliminando los eventos indels y considerando estos eventos.

#### **4.7.3. Análisis de Cambios Poblacionales.**

El estadístico de Tajima ( $D_T$ , [Tajima 1989](#)), asume que una población con cruzamientos aleatorios se halla en equilibrio donde la diferencia ( $D_T$ ) entre el número promedio de las diferencias de nucleótidos entre secuencias ( $\pi$ ) es mayor o menor que el número de sitios polimórficos observados ( $\theta$ ). Es así que puede oscilar entre los siguientes valores:  $D = 0$ , entonces se presenta neutralidad la población de halla en equilibrio neutral,  $D < 0$  entonces hay un exceso de variantes de baja frecuencia, una selección purificadora o direccional, ó es evidencia de expansión poblacional (luego de un evento “cuello de botella”),  $D > 0$  entonces hay un exceso de variantes de frecuencia intermedia, selección balanceada ó es evidencia de una subdivisión poblacional. El estadístico de Fu's  $F_S$ , ([Fu, 1997](#)) oscila entre los siguientes valores:  $F_S < 0$ , cuando existe un exceso de mutaciones recientes o exceso del número de alelos. Así mismo cuando el valor es extremadamente negativo es una fuerte evidencia contra la neutralidad de las mutaciones, como una indicación de que la desviación es causada por crecimiento poblacional y/o selección.  $F_S > 0$ , es evidencia de una deficiencia de alelos, que puede ser esperada de un reciente evento de un cuello de botella poblacional. El estadístico  $R_2$  ([Ramos-Onsins y Rozas, 2002](#)), proporciona valores entre 0 y 1, si este adquiere valores cercanos a cero es evidencia de que en la historia evolutiva de la población hay un evento de expansión poblacional reciente,

mientras que valores cercanos a 1, indican que la población no ha evidenciado cambios significativos en sus tamaños poblacionales. Este estimador tiene mayor fuerza estadística que los otros usados en especial cuando el tamaño de muestra es pequeño. Estos tres estadísticos se obtuvieron para la población total, bajo el modelo de coalescencia, implementado en el programa DNAsp 4.50.3, considerando unos 10 000 replicaciones, para conocer su valor P.

Se realizó la distribución mismatch entre pares de secuencias bajo, dos modelos poblacionales: uno que asume tamaños poblacionales constantes y otro que asume variación en sus tamaños poblacionales se realizó con DNAsp 4.50.3. El tiempo de expansión poblacional fue estimado con la fórmula  $T = \tau/2u$  ([Rogers y Harpending, 1992](#)), donde  $T$  = tiempo desde la última expansión,  $\tau$  = es el tiempo de expansión y  $2u = (\mu) \cdot (\text{tiempo de generación})$ . (número de bases secuenciadas), siendo  $\mu$  la tasa de mutación por millón de años. El valor tau es el proporcionado en el modelo de expansión proporcionado por DNAsp 4.50.3, el tiempo de generación es 2.5 años (valor intermedio entre la edad de la primera madurez sexual de hembras y machos de merluza). Debido a la falta de una tasa de mutación calibrada para la región de control de las merluza, se usará el valor de 3.9% reportado para el ADNmt de *Gadus morhua* ([Sigurgíslason y Arnason, 2003](#)).

## **V. RESULTADOS.**

### **5.1. Caracterización de la Muestra Biológica.**

El muestreo fue aleatorio en cada lance, 55 individuos fueron hembras (91%) y 5 machos (8%). Se observó una gradiente latitudinal de tallas ([Figura D3](#)). Con respecto a la madurez sexual, un solo individuo se halló en estadio I (2%), 8 en estadio II (16%), 15 en estadio III (30%), 14 en estadio IV (28%), uno en estadio VI (2%), siete en estadio VII (14%), uno en estadio VIII (25%). Así mismo las muestras ART fueron las más superficiales (cerca a los 80m de profundidad) mientras que las restantes (entre 120-400m).

### **5.2. Cebadores Mitocondriales de PCR para SSCP y Secuenciamiento.**

En la [tabla R1](#) se muestran las combinaciones de los cebadores propuestos en el estudio, que han mostrado su utilidad en la amplificación de sectores de la región de control mitocondrial, los cebadores c, f d y HARN12, han sido propuestos en el presente estudio. Se muestra las condiciones de MgCl<sub>2</sub> y temperatura que dieron amplificación óptima en los experimentos de PCR y se muestra el tamaño esperado del fragmento.

Las reacciones de PCR usando como ADN molde al ADN genómico y el fragmento LB, con los cebadores Ld, MG, Md cb y cf, resultaron en fragmentos de tamaño esperado, como se parecía en la figura [R1](#) y [R2](#). Esto indicaría que empleando distintos ADN diana los amplicones obtenidos muestran los mismos tamaños.

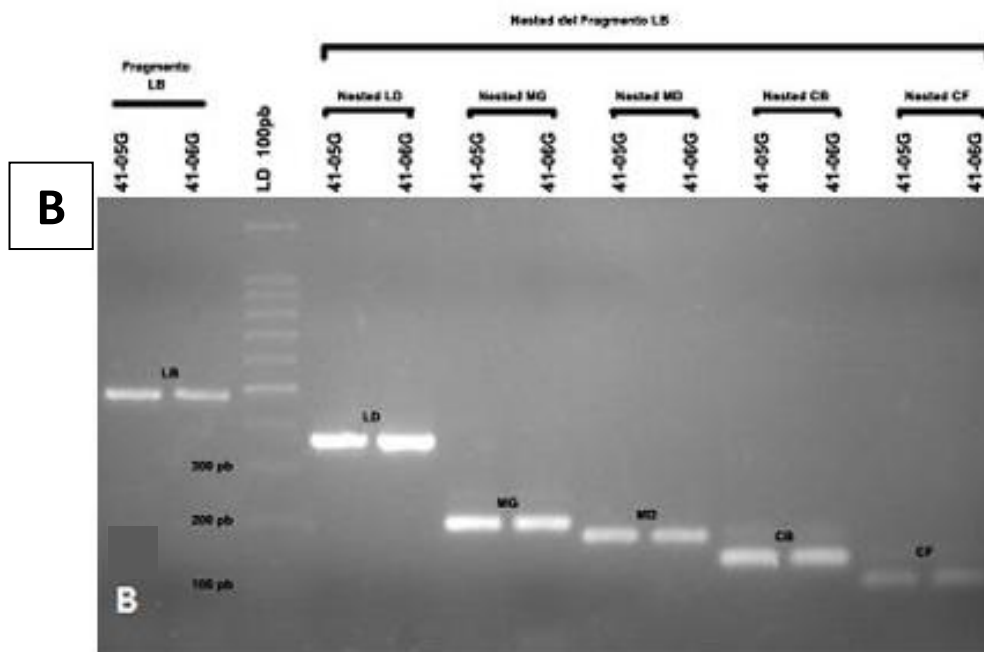
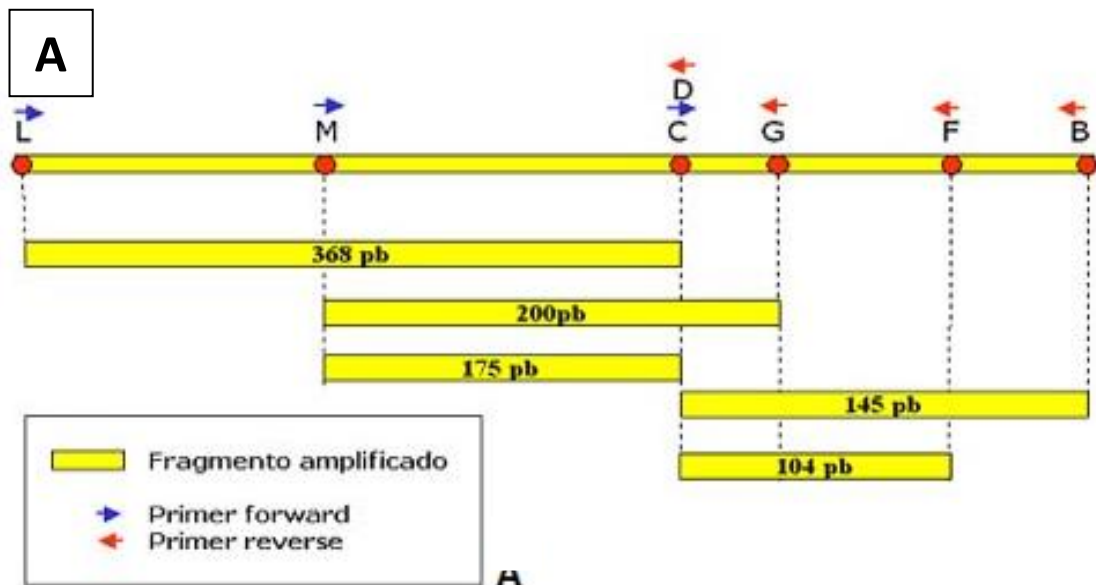
**Tabla R 1.** Condiciones de amplificación de los fragmentos obtenidos.

Fragmento	Par de cebadores	MgCl <sub>2</sub>	Temperatura de annealing (*)	Descripción
cB (145pb)	c / B	1,5 mM	54°C	SSCP En la región HVI
MG (200pb)	MERFPD1 / GADPRD1	1,5mM	54°C	SSCP En la región HVI
Cf (104pb)	c / f	2,5 mM	54°C	En la región HVI
Md (175pb)	MERFPD1 / d	3mM	54°C	En la región HVI
LB (480pb)	L11592 / B	2mM	54°C	Región HVI
Ld (368pb)	L11592 / d	1,5 mM	54°C	En la región HVI
LH (1200pb)	L11592 / HARN12	1.5mM	60°C	Secuenciamiento Región de control completa

( \* ) Se empleó buffer PCR 1X, 250 uM de cada uno de los dNTPs, 10pmol de cada primer y 0.5 u de AmpliTaq DNA polimerase.

Los ciclos de amplificación fueron 30. Todas las reacciones tuvieron una temperatura inicial de denaturación de 94°C por 5 minutos y un periodo final después de los ciclos de amplificación de 72°C por 5 minutos. Durante los ciclos de amplificación se siguió el siguiente esquema general:

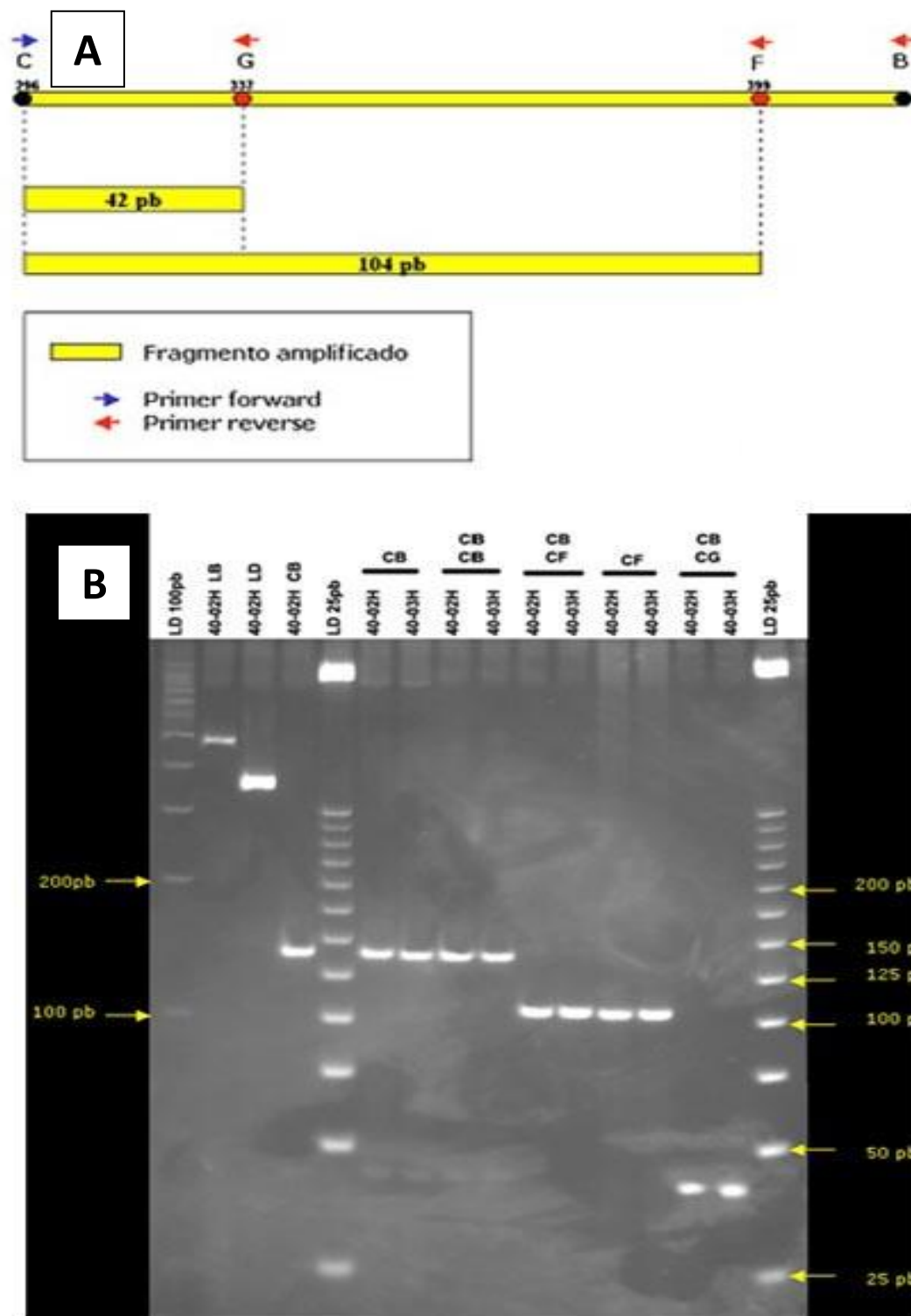
- Desnaturalización: 94°C por 45 segundos
- Annealing: temperatura de annealing por 45 segundos
- Extensión: 72°C por 45 segundos.



**Figura R 1** Reacciones de nested PCR usando como ADN diana el amplicon de la región HVI (entre los cebadores L11592 / cebador B), reportado por [Quinteiro et al \(2001\)](#).

(A) Ubicación teórica de los cebadores y estimación del tamaño esperado de los amplicones en el fragmento LB.

(B) Electroforesis en agarosa de los amplicones estimados teóricamente en A obtenidos por PCR-anidado con el fragmento LB.



**Figura R 2.** Reacciones de nested PCR para el fragmento de 145pb (CB) y el de 104pb (CF).

(A) Ubicación teórica y tamaño esperado de los amplicones para el fragmento CB.

(B) Electroforesis en 2.5% agarosa de las reacciones de PCR-anidado.

CB: fragmento obtenido a partir de ADN genómico, (CB/CB) PCR anidado CB con CB, (CB/CF) PCR anidado del CF en CB, CF: fragmento obtenido a partir de ADN genómico, (CF/CG) PCR anidado de CF con CG.



Se secuenció la región control completa (ARNt Pro – Dloop – ARNt Phe – ARNr12S) en 21 individuos de merluza, empleando el primer L11592 y el diseñado en el presente estudio HARN12 (Combinación LH). En la [tabla R2](#) y [figura R3](#) se muestra el porcentaje de pb cubierto para los dos análisis empleados en el presente estudio. El análisis de SSCP cubre un 35% de la región de control completa y un 73.9 de la región HVI, mientras que en el análisis de secuenciamiento se cubre el total de pb de la región de control.

**Tabla R 2** Porcentaje de pb analizados en las dos técnicas usadas en el presente estudio: SSCP y secuenciamiento.

<b>Segmentos del ADNmt analizados</b>	<b>Longitud pb</b>	<b>% a</b>	<b>% b</b>	<b>% (G+C)</b>
<b>Análisis por Secuenciamiento D-loop</b>	899	100		36.9
Región HVI, Quinteiro et al (2001)	433	48	100	--
<b>Análisis de Secuencias por SSCP</b>	320	35	73.9	--
Fragmento CB ( c y b )	145	16	33.5	42.03
Fragmento MG (MERFPD y GADPR)	200	22.2	46.2	42.13

% a: basado en el total de pb del D-loop,

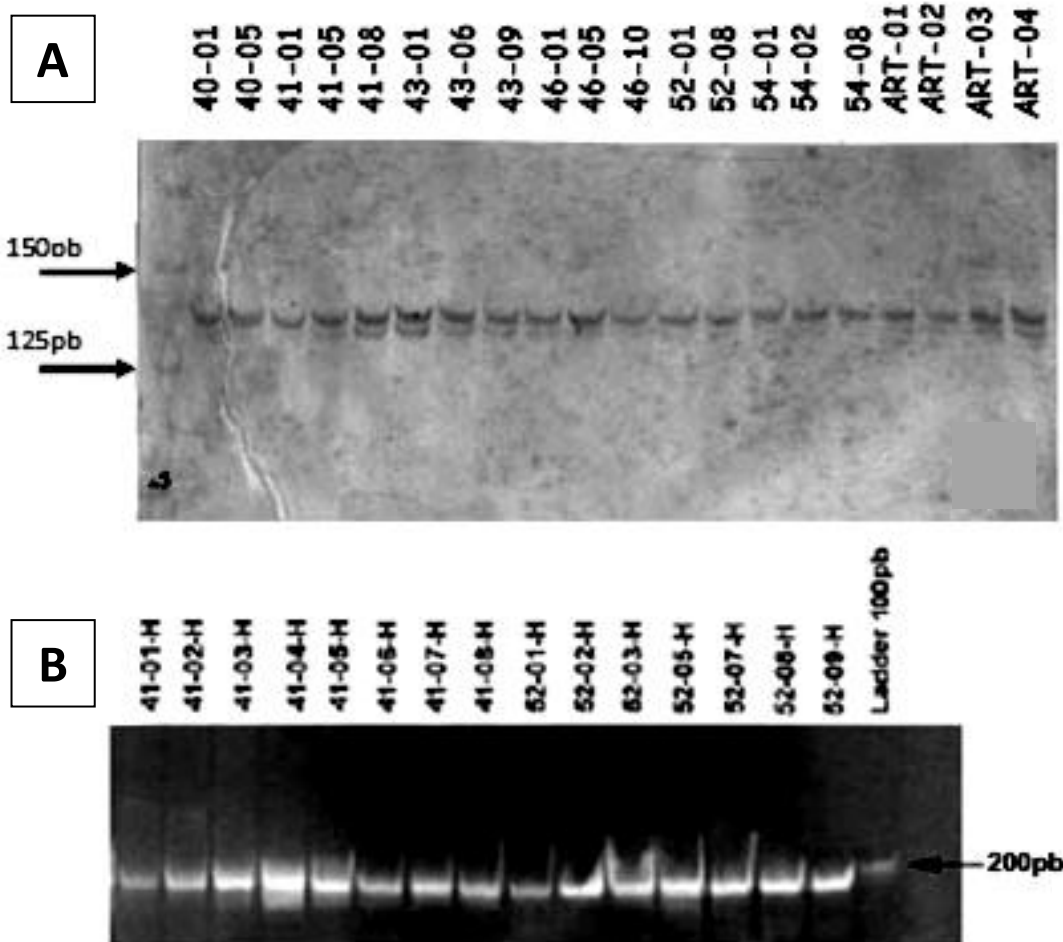
%b: basado en la región HVI según Quinteiro et al (2001),

% (G+C): porcentaje de citosina + guanina en el fragmento.

### **5.3. Polimorfismos de Longitud en la HVI.**

En el dominio izquierdo HVI de la región de control, no se observaron polimorfismos de longitud en los fragmentos MG y cb. ([Figura R4](#)). Pero el análisis de secuenciamiento muestra que en el dominio derecho HVII de la región de control se presenta un motivo repetitivo de ocho pb (ACAATATT) con la siguiente frecuencia: 5/21 (4 repeticiones) y 16/21 (3 repeticiones) ([Figura R3](#)).





**Figura R 4.** No presencia de polimorfismos de longitud.

(A) No se observa polimorfismos de longitud en el fragmento CB cuyo tamaño esperado es de 140pb.

(B) No se observa polimorfismos de longitud en el fragmento MG cuyo tamaño esperado es de 200pb.

Se halló dos variantes en el amplicon CB (Figura R6), que se denominaron V1CB (40-01) y la V2CB (los restantes), bajo las siguientes condiciones:

- Acrilamida al 8% (stock 24%, 1:41), TBE 1X, En placas de vidrio de 20cm X 20cm con un grosor de gel 0,2m. En condiciones de electroforesis en buffer TBE 1X, 400 V por 2,5 horas.
- Acrilamida al 10% (stock 24%, 1:41), TBE 1X, glicerol al 10%. En placas de vidrio de 20cm X 20cm con un grosor de gel 0,2m. En condiciones de electroforesis en buffer TBE 1X, 400 V por 5 horas.

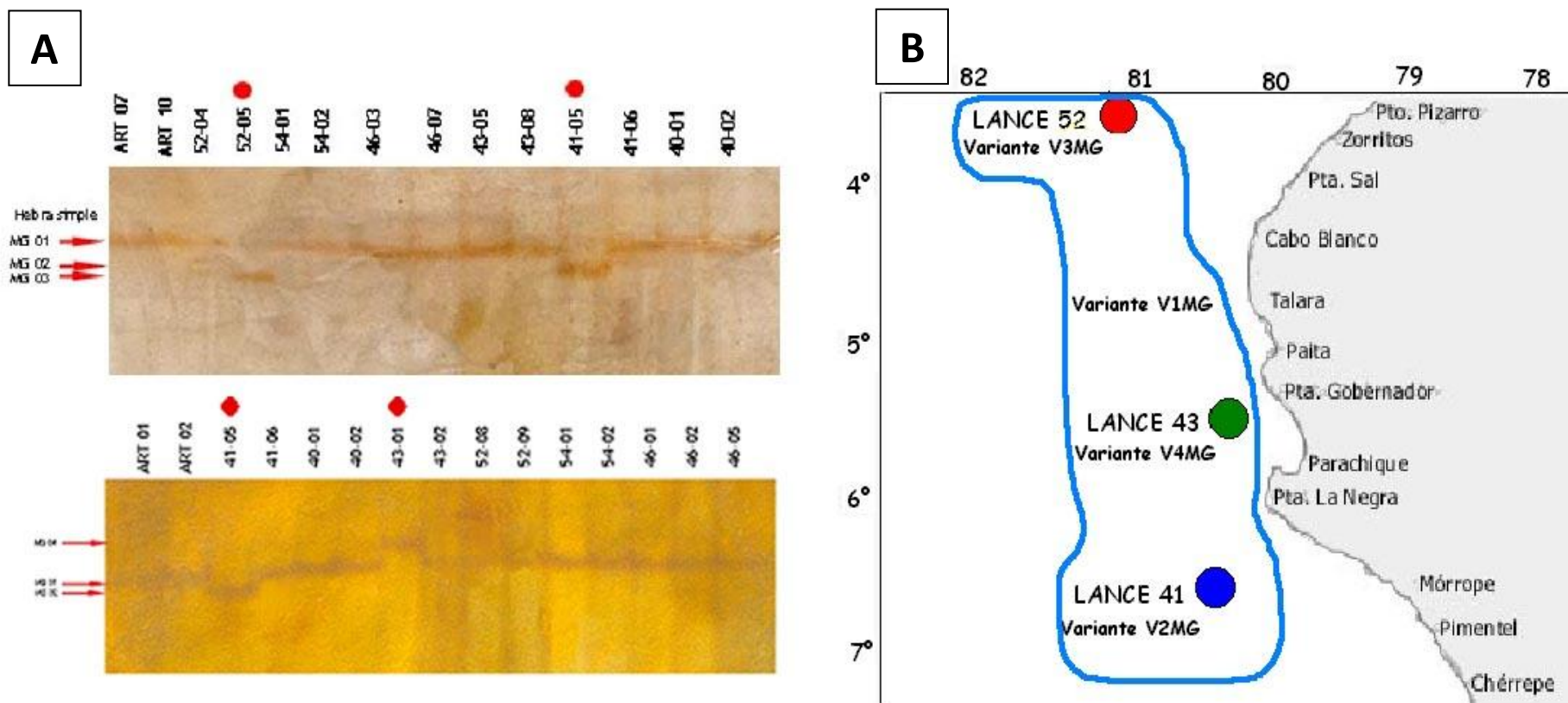
Las variantes V1MG y V1CB agrupan un gran porcentaje de la muestras analizadas por lo que se asume deberían compartir la misma secuencia nucleotídica. El segmento MG presenta una mayor variabilidad (número de variantes SSCP) que el segmento CB, como se puede apreciar en la [Tabla R3](#).

El análisis estadístico de las variantes del fragmento MG, acepta la hipótesis de homogeneidad, obteniéndose un prueba de  $X^2 = 14,22$ , (gl = 6 x 3 = 18) ( $p > 0.05$ ). El análisis estadístico de las variantes del fragmento CB, acepto la hipótesis de homogeneidad, obteniéndose un estadístico  $X^2 = 9,22$ , (gl = 6 X 1 = 6) ( $p > 0.05$ ). En ambos casos se acepta la hipótesis de distribución homogénea de las variantes genéticas detectadas por SSCP.

**Tabla R 3.** Frecuencias de las Variantes SSCP detectadas en la población usando los fragmentos MG y CB.

Variantes MG		
Variantes	Frec. Abs	Frec. Rel
V1MG	57	95.00
V2MG	1	1.67
V3MG	1	1.67
V4MG	1	1.67

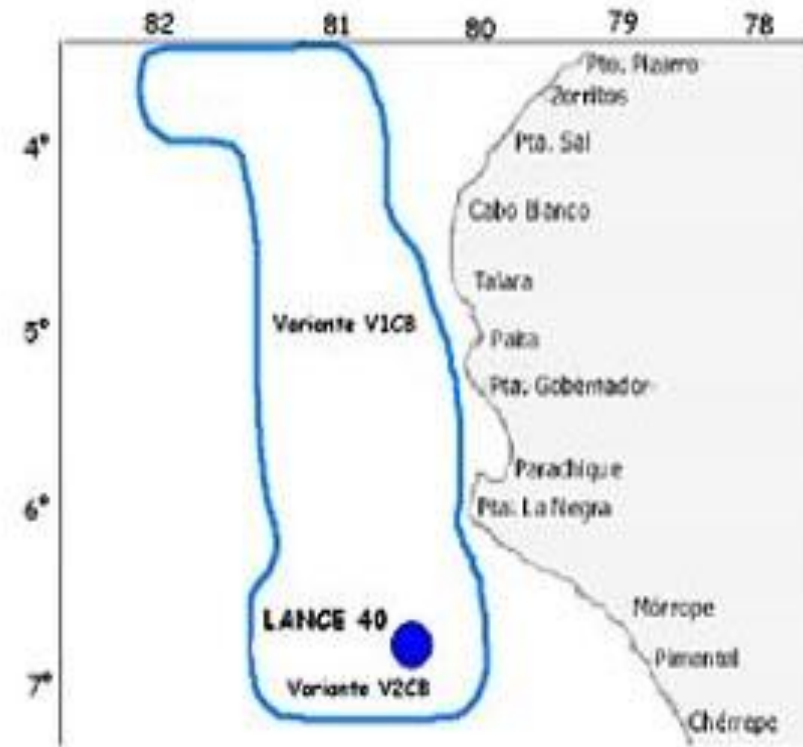
Variantes CB		
Variantes	Frec. Abs.	Frec. Rel.
V1CB	59	98.33
V2CB	1	1.67



**Figura R 5.** Distribución Geográfica de las Cuatro Variantes SSCP del fragmento MG.

(A) Variantes SSCP detectadas para el fragmento MG (200pb).

(B) Distribución geográfica de las cuatro variantes del fragmento MG detectadas por SSCP. La variante V1MG es la que posee mayor distribución.

**A****B**

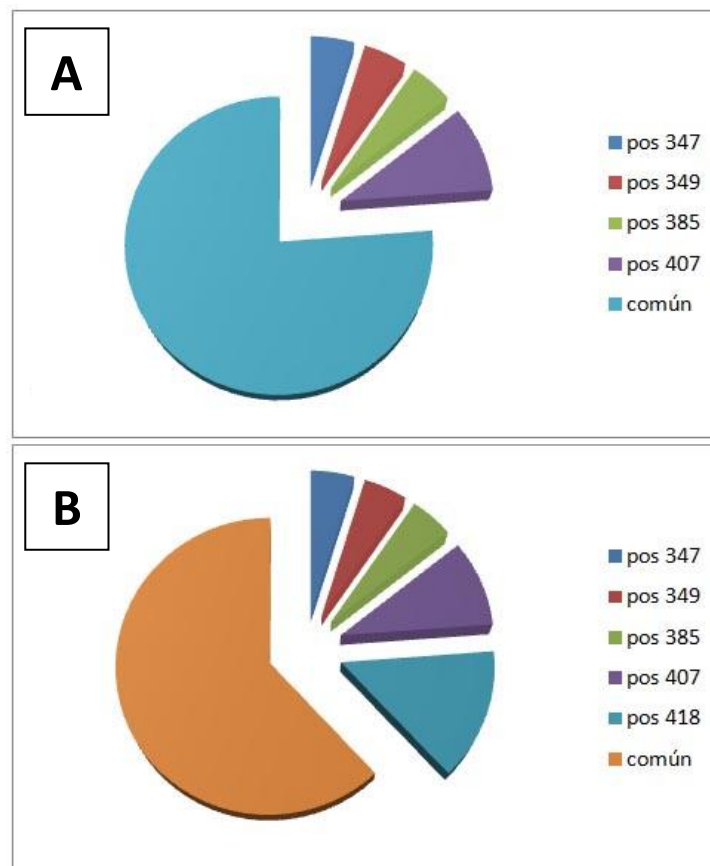
**Figura R 6.** Distribución Geográfica de las Dos Variantes SSCP del fragmento CB.

(A) Variantes SSCP detectadas para el fragmento CB (100pb).

(B) Distribución geográfica de las dos variantes del fragmento CB detectadas por SSCP. La variante V1CB es la que posee mayor distribución.

### 5.5. Polimorfismos SSCP vs Polimorfismos de Secuencia.

Las variantes SSCP de mayor frecuencia detectadas en los segmentos MG y CB (V1MG y V1CB), no comparten al 100% la misma secuencia, la técnica no puede discriminar entre un 24% y 38% de individuos diferentes. Por lo tanto el porcentaje de eficiencia de detección en el presente estudio mediante SSCP para fragmentos entre 200 y 140pb, es de 76% y 62% respectivamente ([Figura R 7](#)).



**Figura R 7.** SNPs detectados mediante secuenciamiento en las variantes SSCP más frecuentes (n =21)

(A) SNPs detectados en el grupo poblacional según la variante SSCP, V1MG. 76% para la variante común.

(B) SNPs detectados en el grupo poblacional según la variante SSCP, V1CB. 62% para la variante común.

**Nota:**

4.76% para la torta delgada (pos 347, 349, 385).

9.52% para la torta intermedia (pos 407).

14.29% para la torta mayor (pos 418).

## 5.6. Diversidad Genética de la Región de Control Mitocondrial.

Se obtuvo la secuencia completa de la región de control de 21 individuos (35% de los individuos muestreados, 20 fueron hembras), con una longitud de 899 pb, 23 sitios polimórficos (2 transversiones, 21 transiciones, aprox. 2.56% de sitios variables), ver [Tabla R4](#). Solo se observaron sitios con dos variantes. En el dominio derecho del D-loop se observó una repetición de un octanucleótido (ACAATATT).

El análisis de los 21 individuos permite agruparlos en 16 haplotipos, ver [Tabla R5](#) para identificar que individuos fueron secuenciados.

**Tabla R 4.** Distribución de los Sitios Nucleotídicos de la Región de Control Mitocondrial.

---

Total de sitios nucleotídicos	: 899
Sitios son gaps o sin datos	: 10
Sitios monomórficos	: 866
Sitios polimórficos	: 23
Singletones	: 13 (8, 106, 131, 132, 186, 277, 347, 349, 385, 458, 525, 617, 775).
Informativos	: 10 (56, 63, 105, 108, 136, 292, 407, 418, 470, 625)
Sitios polimórficos	: 23
Transversiones	: 2
Transiciones	: 21

---

Los índices de diversidad genética en distintos niveles de jerarquías poblacionales (lances, grupos y total) se muestran en la [tabla R6](#), entre paréntesis se indica la desviación estándar de cada uno de los valores. A nivel local L52, presenta bajo valor de diversidad nucleotídica con respecto a las otras localidades, pero también posee menor muestra (n=2). A nivel de grupos en norte posee bajos valores de diversidad ( $h$ ,  $H_d$  y  $\pi$ ) con respecto al centro y sur. La población total presenta en general altos valores de diversidad haplotípica pero bajos de diversidad nucleotídica.



**Tabla R 5.** Haplotipos Detectados en la Merluza peruana, basados en la secuencia de la región de control mitocondrial.

			SIP	*** * * * ** * *	10
			TOT	*****	23
				11111112233344445667	
				5600033387944801572127	
				86356812667279578805755	
Haplo	f	Muestras			
Hap_1	1	ART06	ACATACTTTCAACGGTACAGTGA		
Hap_2	5	ART08, ART10 4602, 4002, 5205	.TG..T..C.....GA.A.		
Hap_3	1	ART09	.TGC.T..C.....G.GA.A.		
Hap_4	1	ART04	.TG..T..C.....CG.GA.A.		
Hap_5	1	4003	GTG..T.....GA.A.		
Hap_6	1	4005	.TG.....C.....G.GA.AG		
Hap_7	1	4102	.TG.GT..CT.....GA.A.		
Hap_8	2	4105, 4108	.TG..T..C..G.....GA.A.		
Hap_9	1	4106	.....A...		
Hap_10	1	4107	.TG..TC.C.....GA.A.		
Hap_11	1	4301	.TG..T..C.G.....GA.A.		
Hap_12	1	4302	.TG..T..C.....C.TGA.A.		
Hap_13	1	4304	.TG..T..C...GA....GACA.		
Hap_14	1	4603	.TG..T..C.....C...GA.A.		
Hap_15	1	4604	.....CC.....A.A.		
Hap_16	1	5206	.TGC.T..C.....GA.A.		

**Leyenda:**

Haplo : nombre de los haplotipos.  
f :frecuencia absoluta de los haplotipos.  
muestras : individuos que poseen el haplotipo).  
SIP : Sitios informativos polimórficos.  
TOT : Total de sitios polimórficos.

**Tabla R 6.** Índices de Diversidad Genética en Tres Jerarquías Poblacionales: Lances, Grupal y Total.

	Poblaciones	N	Índices de Diversidad				
			Eta / S	h	Hd	$\pi$	K
<b>LANCES</b>	<b>ART</b>	5	10 / 23	4	0.9 (0.02592)	0.00472 (0.0000033)	4.20
	<b>L 52</b>	2	1 / 23	2	1 (0.25)	0.00112 (0.0000003)	1
	<b>L 40</b>	3	5 / 23	3	1 (0.07407)	0.00375 (0.0000016)	3.33
	<b>L 41</b>	5	10 / 23	4	0.9 (0.02592)	0.00472 (0.0000023)	4.20
	<b>L 43</b>	3	6 / 23	3	1 (0.07407)	0.00450 (0.0000017)	4
	<b>L 46</b>	3	6 / 23	3	1 (0.07407)	0.00450 (0.0000032)	4
<b>GRUPO</b>	<b>NORTE</b>	7	7 / 23	4	0.9 (0.02592)	0.00315 (0.0000016)	2.80
	<b>CENTRO</b>	8	15 / 23	7	0.964 (0.00596)	0.00462 (0.0000018)	4.11
	<b>SUR</b>	6	13 / 23	7	0.964 (0.00596)	0.00426 (0.000001)	3.79
<b>TOTAL</b>	<b>TOTAL</b>	21	23 / 23	16	0.948 (0.00157)	0.00402 (0.0000005)	3.57

**Eta:** número total de mutaciones; **S:** número total de sitios variables; **h:** número de haplotipos; **Hd:** diversidad haplotípica (desviación estándar);  $\pi$ : diversidad nucleotídica (desviación estándar), **k** = número promedio de diferencias por nucleótido. Obtenido de DNAsp 4.50.3.jhpñ

### 5.7. Análisis de Diferenciación y Estructura Poblacional.

El test de diferenciación genética global entre las muestras a nivel de localidades y grupos, no revela diferencias significativas ( $P = 0.11$  y  $P = 1.00$ , respectivamente). Ninguno de los valores  $P$  entre los pares de localidades y entre los pares de grupos analizados fueron significativos ([Tabla R7](#)). Adicionalmente se deduce que el marcador no es sensible para detectar diferenciación genética en esta población de merluza.

**Tabla R 7.** Valores  $P$  del Test Exacto de Diferenciación entre pares poblacionales y grupos.

A. Test exacto de Diferenciación Genética entre las Seis Localidades					
	ART	L 40	L41	L43	L 46
ART					
L 40	1.00000 + 0.0000				
L41	0.45301 + 0.0053	0.46110 + 0.0066			
L43	1.00000 + 0.0000	1.00000 + 0.0000	0.47035 + 0.0045		
L46	1.00000 + 0.0000	1.00000 + 0.0000	0.46142 + 0.0041	1.00000 + 0.0000	
L52	1.00000 + 0.0000	1.00000 + 0.0000	0.51997 + 0.0041	1.00000 + 0.0000	1.00000 + 0.0000

B. Test Exacto de Diferenciación Genética entre los tres Grupos		
	NORTE	CENTRO
NORTE		
CENTRO	1.00000 + 0.0000	
SUR	1.00000 + 0.0000	1.00000 + 0.0000

Entre las poblaciones las distintas localidades  $H$  varía de 0.9 a 1,  $\pi$  entre 0.00112 a 0.00472, siendo el L52 la que presenta la menor diversidad nucleotídica, posiblemente a que posee el menor tamaño de muestra. No se encuentra diferencias significativas de los valores  $\pi$  observados entre las localidades de los grupos norte, sur y centro ( $P = 0.59$ ), al aplicar un análisis de varianza entre los valores obtenidos.

El análisis de varianza molecular, AMOVA, no detecta diferencias significativas entre los distintos niveles jerárquicos descritos ([Tabla R8](#)). La variación aumenta a medida que la jerarquía poblacional disminuye en complejidad de agrupación, así la variación entre los tres grupos analizados es baja (0.2%), mientras que la variación debida a las

diferencias dentro de cada grupo es ligeramente mayor (2.4%) y cerca del 97.4% de la variación observada se explica por las diferencias dentro de cada localidad. La variación entre los grupos norte y sur es mínima (0.16%) y sus valores F no son significativos.

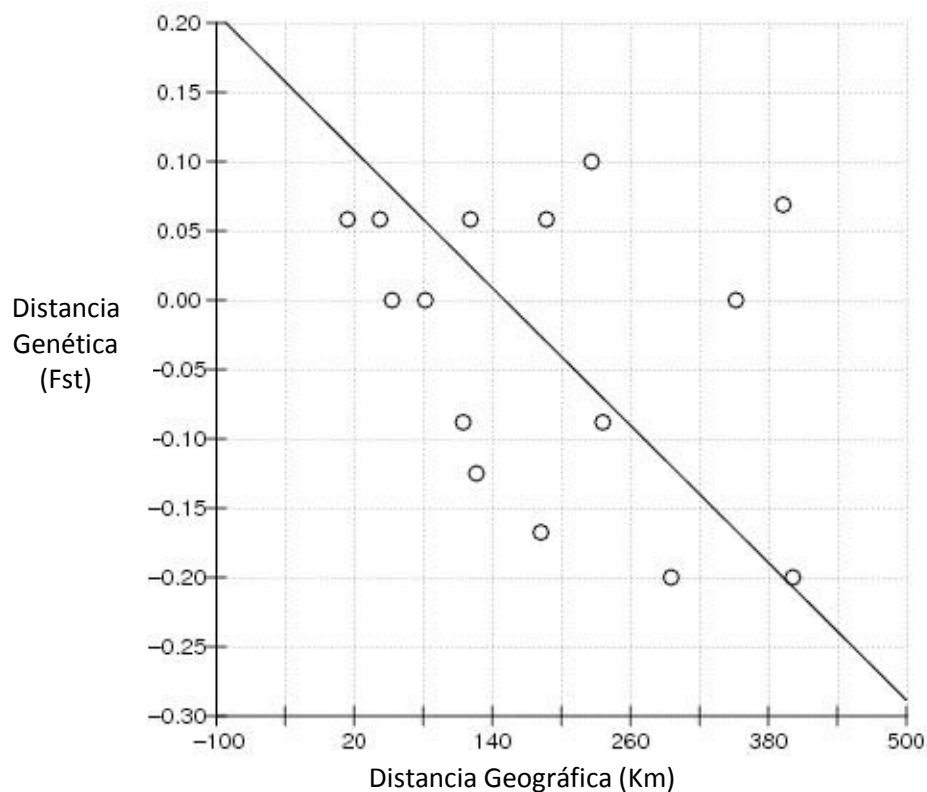
**Tabla R 8.** Análisis de Varianza Molecular basado entre distintas jerarquías poblacionales

	g.l	Varianza de los componentes	Porcentaje de variación	Estadístico $\Phi$ (valor P)
<b>Considerando el total de la muestra</b>				
Entre grupos (norte, centro y sur)	2	0.001	0.20	$F_{CT} / \Phi_{CT}$ : 0.00199 n.s. P = 0.82
Entre poblaciones dentro de cada grupo	3	0.01197	2.40	$F_{SC} / \Phi_{SC}$ : -0.02401 n.s. P = 0.52
Dentro de las seis poblaciones	15	0.48667	97.40	$F_{ST} / \Phi_{ST}$ : 0.02595 n.s. P = 0.15
<b>Considerando únicamente a grupos con un máximo de separación geográfica.</b>				
Entre grupos (norte y sur)	1	0.00078	0.16	$F_{CT} / \Phi_{CT}$ : 0.00157 n.s. P = 0.66

No se detectó significativa correlación entre la distancia genética y geográfica ([Figura R8](#)).

Los test de diferenciación poblacional basados en secuencias (Snn, Z) y los valores de flujo génico (Nm) se muestran en la [tabla R9](#). Los estadísticos Snn y Z, proporcionan valores no significantes, no rechazándose la hipótesis de homogeneidad

genética. Igualmente los valores de migrantes por generación son altos, especialmente entre norte y el centro, sur y el centro (áreas relativamente adyacentes, considerando que la región centro es un lugar de paso entre los extremos norte y sur), pero valores de migrantes por generación 40 veces menor entre el grupo norte y sur. El valor  $G_{st}$  calculado para la población es muy bajo, 0.004.



**Figura R 8.** Modelo de Aislamiento por Distancia entre distancia genética ( $F_{st}$ ) y geográfica (km), usando el modelo de aislamiento por distancia. ( $r = -0.3114$ ,  $P = 0.8080$ ,  $R^2 = 9.7\%$ ).

**Tabla R 9.** Valores de dos Estadísticos de Diferenciación Poblacional y de Flujo Génico entre los distintos grupos poblacionales.

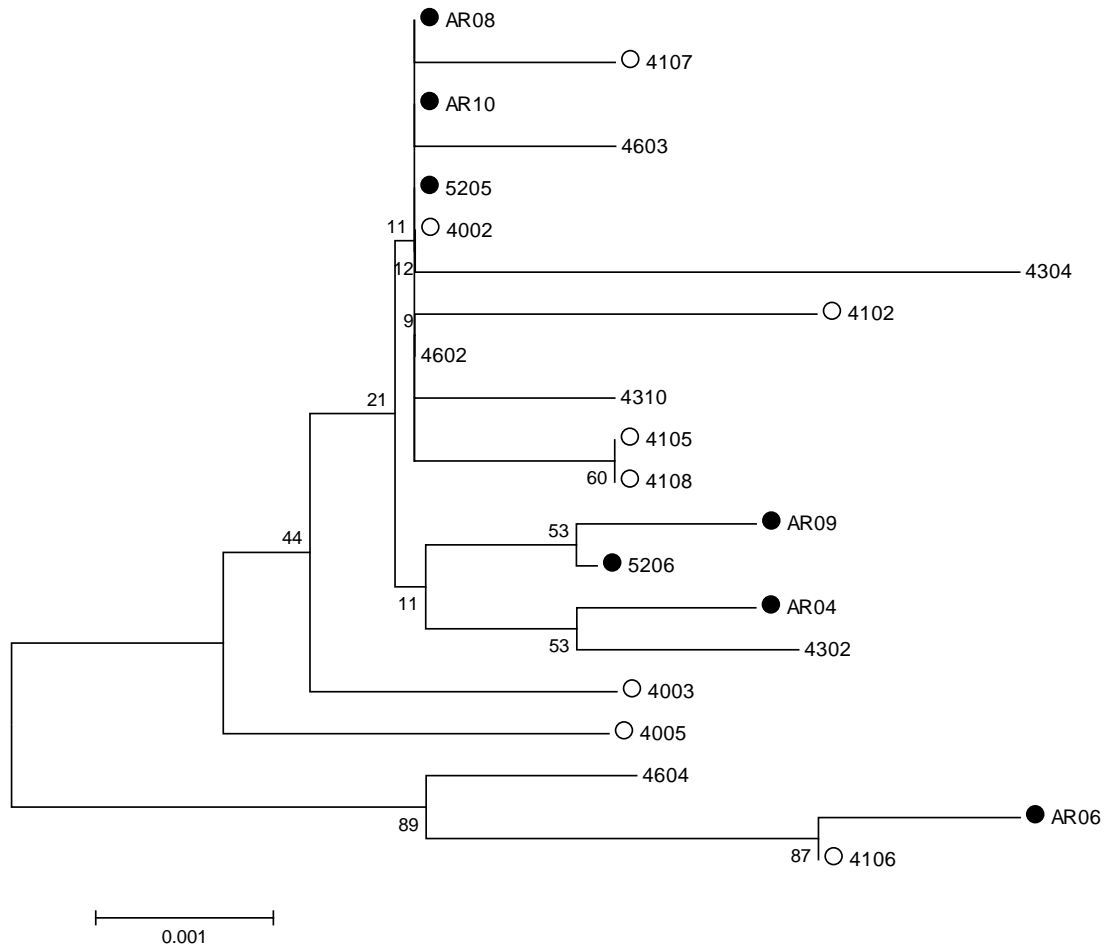
	Snn ( <a href="#">Hudson, 2000</a> )	Z ( <a href="#">Hudson et al., 1992</a> )	Nm ( <a href="#">Nei, 1973</a> )
Entre los lances	0.17324 n.s. (P = 0.2910)	115.47 n.s. (P = 0.9070)	1260
NORTE – CENTRO – SUR	0.34512 n.s. (P = 0.3030)	106.058 n.s. (P = 0.6510)	51.90
NORTE - SUR	0.50111 n.s. (P = 0.3610)	52.54978 n.s. (P = 0.5560)	25.33
NORTE – CENTRO	0.41667 n.s. (P = 0.6530)	38.63439 n.s. (P = 0.4850)	1092
SUR – CENTRO	0.42857 n.s. (P = 0.8010)	45.71119 n.s. (P = 0.6860)	Alto tasa de migrantes.

### 5.8. Análisis Filogenético y Haplotípico.

El árbol filogenético neighbor-joining ([figura R9](#)), muestra únicamente un nodo con 89% de apoyo al linaje compuesto por las muestras 4604, AR06 y 4106, al que denominaremos linaje o clado A, los cuales se hallan en distintas ubicaciones geográficas, por ejemplo AR06 se halla separada de 4604 y 4106, por casi 114km (61 millas náuticas) y 226km (122 millas náuticas), respectivamente. El grupo restante es denominado linaje o clado B que en su segundo nodo basal se halla apoyada por un 44% de bootstrap.

En general las 21 secuencias no se agrupan a lugares geográficos discretos, lo que indica una distribución filogenética aleatoria que no facilita una asignación geográfica.

En la [figura R10](#) se representa la red haplotípica MSN (Minimun Spanning Netwok, “red de haplotipos de mínimos pasos”), bajo dos modelos de construcción de haplotipos, los cuales se caracterizan por un alto número de haplotipos únicos que están cercanamente relacionados a un simple haplotipo común central.



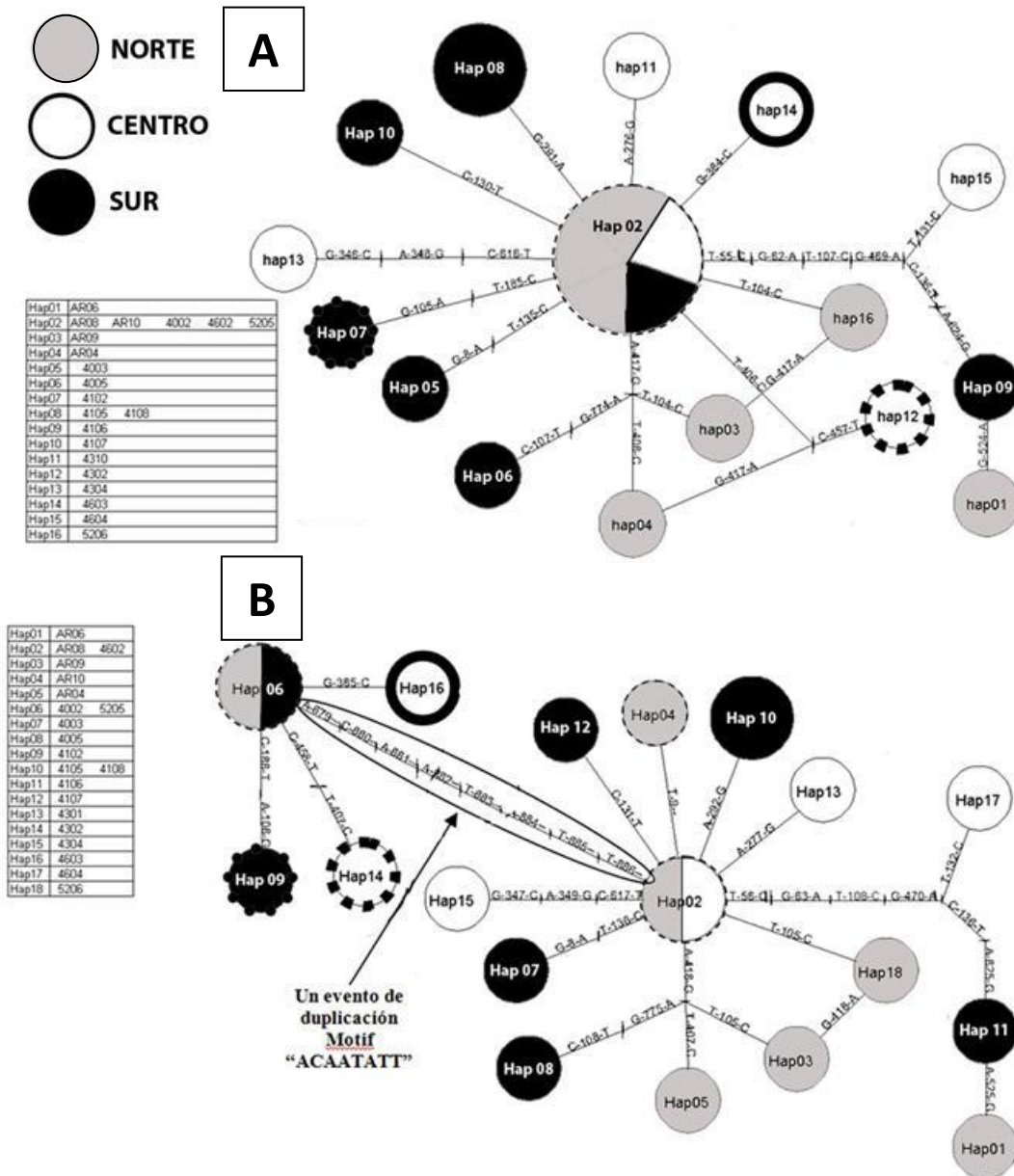
**Figura R 9.** Relaciones Evolutivas usando el árbol NJ (Neighbor Joining) basándose en las secuencias de ADN de la región de control mitocondrial de *Merluccius gayi peruanus*. Los círculos negros indican las muestras de la región norte, los blancos las de la región sur y las que no poseen indicador a la región centro.

En ambos modelos, se observa dos características en común: (a) la presencia del mismo grupo apoyado con un 89% de bootstrap en el árbol NJ, se halla separado del haplotipo ancestral por cuatro eventos mutacionales (T56C, G63A, T108C y G470A) y (b) los haplotipos derivados se separan del haplotipo ancestral por uno o dos eventos mutacionales, con mayor frecuencia (83% - 80% para cada modelo respectivamente), que los haplotipos derivados separados por tres eventos mutacionales (16.6% y 20%, respectivamente). Esto sugiere que la merluza peruana probablemente ha presentado un reciente evento de expansión poblacional y que el haplotipo central común es el haplotipo ancestral.

Únicamente en el modelo MSN que considera los eventos indels (inserciones y deleciones), se observa la presencia de un grupo separado del haplotipo ancestral por 8 eventos indels. Estos ocho sitios son consecutivos (pos879 a pos886), se hallan al final del 5' de la región de control y corresponden al motivo repetitivo ACATATT.

Bajo el modelo MSN de eliminación de eventos gaps, el cual es apoyado por el árbol NJ (Neighbor Joining), se observan la presencia de dos clados: Clado A (4604, AR06 y 4106) y Clado B (las muestras restantes). Ambos clados están constituidos por haplotipos de diferentes orígenes geográficos, que presentan una distribución geográfica aleatoria.





**Figura R 10.** Minimum Spanning Network (MSN) de los haplotipos detectados en *Merluccius gayi peruanus*, empleando dos modelos de formación de haplotipos.

- (A) haplotipos formados sin considerar los gaps.  
(B) haplotipos formados considerando los gaps.

### 5.9. Cambios Demográficos en la Población de merluza.

Los valores de los estadísticos de neutralidad y su significancia se muestran en la [tabla R10](#). Al analizar la población total ( $n=21$ ), los tres estadísticos se desvían significativamente de la hipótesis neutral,  $D_T$  (-1.678,  $P < 0.05$ ) y  $F_S$  (-10.415,  $P = 0$ ) son significativamente negativos y  $R_2$  (0.061,  $P = 0$ ) posee valores significativamente

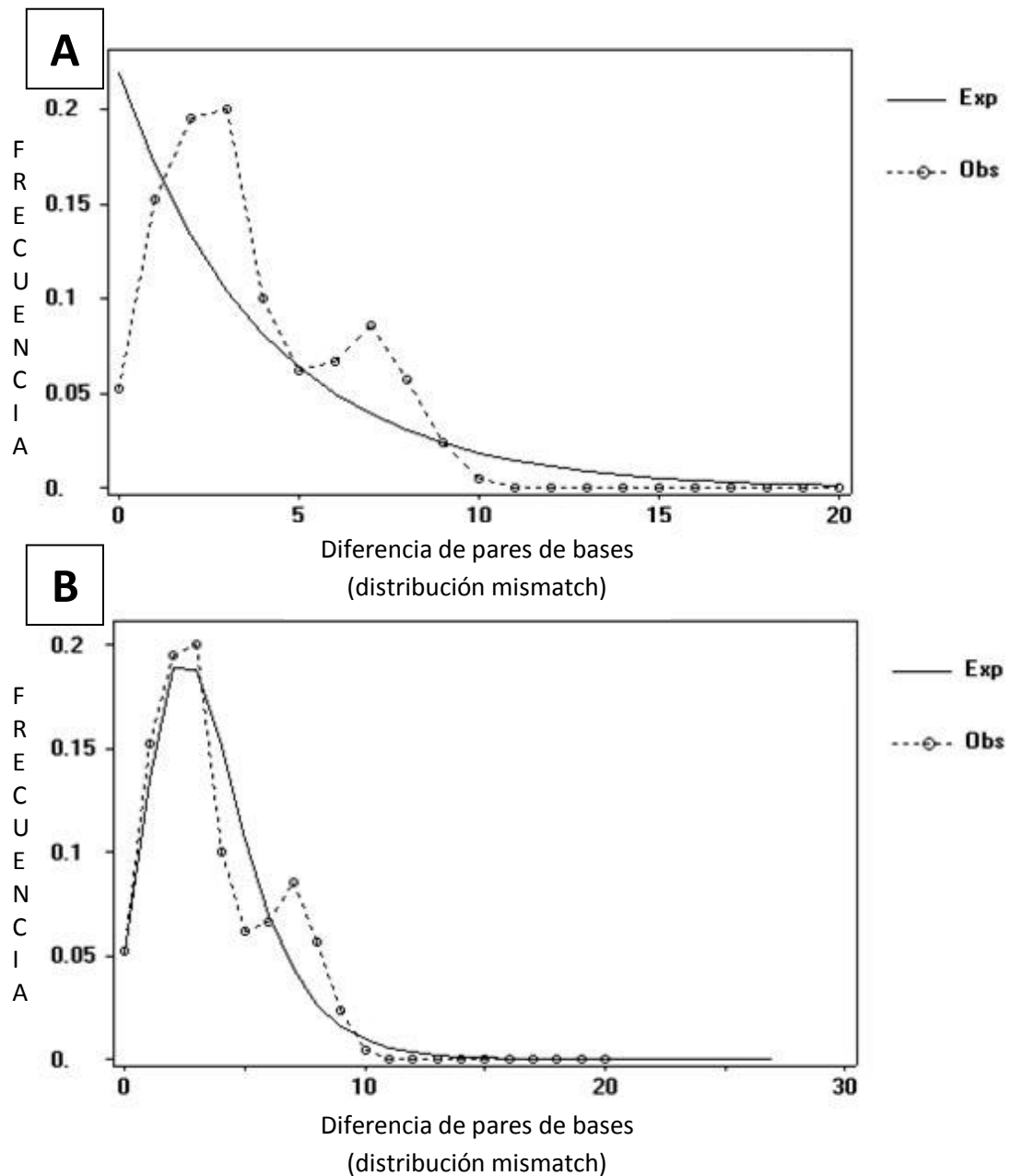
menores que 0.5. Esto sugiere que la población de merluza atravesó un evento reciente de expansión poblacional.

**Tabla R 10.** Índices de Neutralidad de tres estadísticos  $D_T$ ,  $R_2$  y  $F_u$ 's  $F_s$  en la población total.

	N	Dt	R2 (medio)	Fu's $F_s$
TOTAL	21	-1.67822 (s) $P = 0.039 < 0.05$	0.0611 (s) $P = 0 < 0.001$	-10.415 (s) $P = 0$

El análisis de distribución mismatch ( $n = 21$ ) muestra un buen ajuste hacia el modelo de expansión poblacional ( $r = 0.0260$ ,  $P = 0.041$ ) ([Figura R11 b](#)), pero presenta una distribución bimodal que indicaría posiblemente la existencia de subdivisión poblacional o la presencia de diferentes linajes. Por tal motivo se elaboró una distribución mismatch únicamente con las secuencias del linaje B, obteniéndose una curva unimodal ([Figura R12 a](#)).

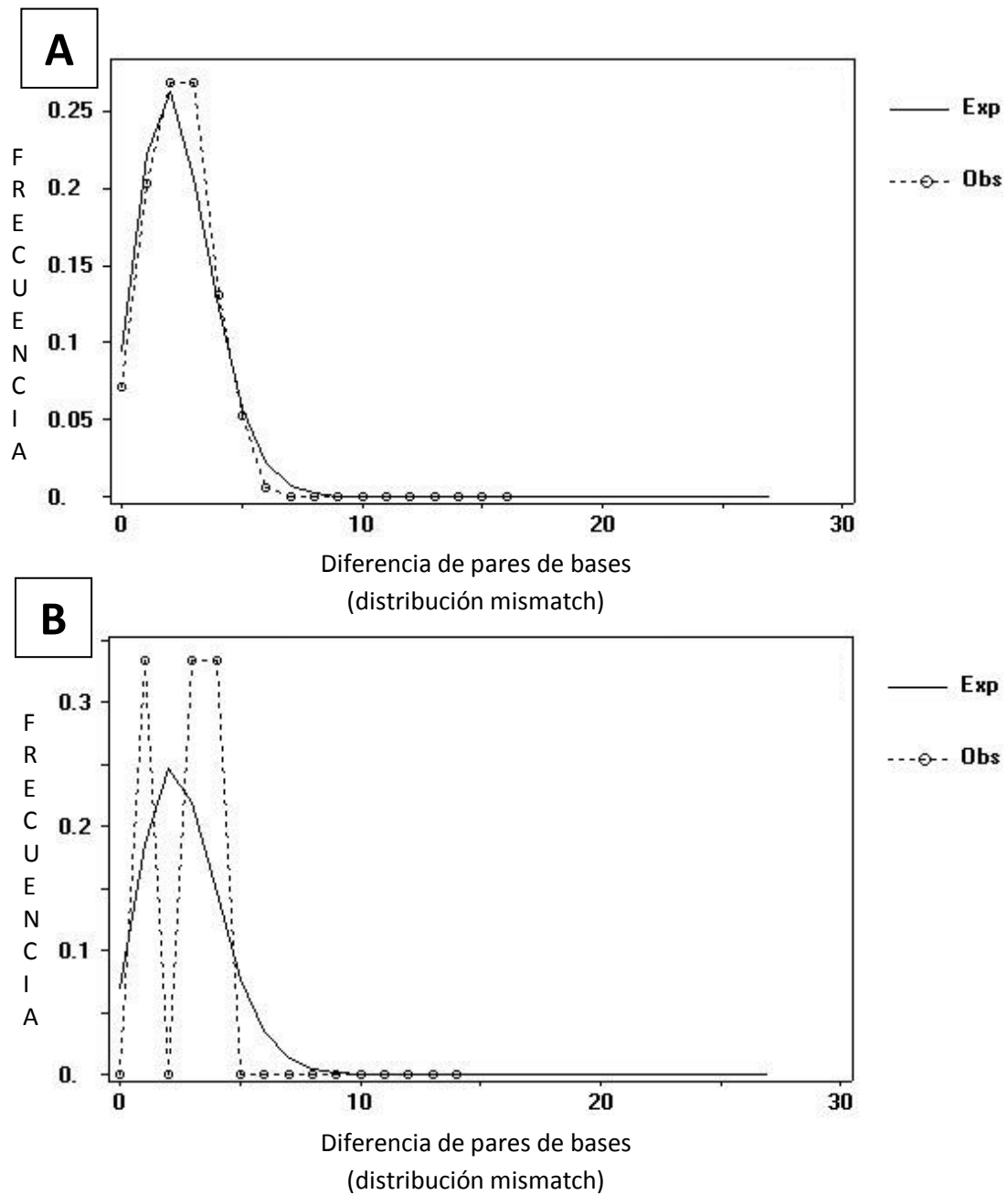
Para realizar el cálculo de tiempo de expansión se tomo en cuenta el valor calculado para el total de secuencias. Así con el valor de  $\tau = 2.073$ , un tiempo generacional de 2.5 años, una longitud del marcador de 899pb y considerando una tasa de mutación de 3.9% se obtiene una fecha alrededor de 12 136 años como el período el cual se produjo la última expansión poblacional de *Merluccius gayi peruanus*.



**Figura R 11.** Modelos Poblacionales sobre la los Cambios Poblacionales de la Merluza Peruana, usando la distribución de mismatch basada en el número de diferencias de pares de bases entre secuencias, para el total de población ( $n = 21$ ).

(A) Modelo poblacional bajo la premisa de tamaños poblacionales constantes.

(B) Modelo poblacional bajo la premisa de variación en los tamaños poblacionales. (Tau = 2.073;  $r=0.0260$ ,  $P < 0.05$ ).



**Figura R 12.** Modelos sobre los cambios poblacionales usando la distribución de mismatch basada en el número de diferencias de pares de bases entre secuencias.

(A) Modelo de expansión poblacional para el linaje B, ( $n = 18$ )

(B) Modelo de expansión poblacional para el linaje A, ( $n = 3$ ).

## VI. DISCUSIÓN

El análisis de secuencias de ADN mitocondrial de *Merluccius gayi peruanus* muestra una alta diversidad genética mitocondrial (aproximadamente cada individuo representa un haplotipo distinto). Los estadísticos de diferenciación poblacional revelan una sola unidad poblacional en el área estudiada. Así mismo el análisis de AMOVA no muestra estructura genética. La alta diversidad genética y falta de diferenciación detectada a escala espacial (p.e. 242 millas náuticas, entre el extremo norte y sur del área de muestreo), puede explicarse por el mantenimiento de grandes tamaños poblacionales característicos de las merluzas del clado americano ([Roldan et al., 1999](#)), los cuales no son muy sensitivos a deriva genética ([De Woody y Avise, 2000](#)). Y además los indicadores de neutralidad como D-Tajima, Fu's Fs y R2 indican desvíos de la neutralidad, sugiriendo que la población ha evidenciado un período de expansión poblacional reciente, lo cual se refleja con una red haplotípica con una alta proporción de uno o dos eventos mutacionales de separación con el haplotipo ancestral.

### 6.1. Sensibilidad de la Técnica de SSCP.

El secuenciamiento directo es el mejor método para conocer las mutaciones, pero si el estudio comprende cientos de muestras este se vuelve laborioso y costoso, con el riesgo de que muchas de las muestras posean la misma secuencia, es allí donde la técnica de SSCP aplicada a estudios de genética poblacional ([Sunnucks et al., 2000](#)), se concibe como una técnica presecuenciamiento que agrupa a las muestras por similitud de secuencia, permitiendo así disminuir la obtención de secuencias iguales entre diferentes individuos.

La detección de variantes de SSCP, fue notoria en matrices de poliacrilamida en glicerol al 10%, las matrices que no poseían glicerol no revelaban diferencias. Para el fragmento de 200pb el glicerol fue necesario para observar las variantes. Mientras

que para el fragmento de 145pb las variantes se detectaron en ausencia de glicerol, pero la resolución de la migración diferencial, fue mayor en presencia de glicerol. Observación similar es reportada por [Estrada-Cuzcano et al \(2005\)](#), donde una mayor cantidad de glicerol incrementa la sensibilidad. Además se observó que al aumentar la concentración de AKA de 8% a 10% en el fragmento de 145pb se delineaba mejor las bandas y se disminuía la difusión de estas, lo que facilitaba su visualización.

El presente estudio muestra una sensibilidad de la técnica SSCP entre 76% y 62% (Figura R7) para fragmentos de 200pb y 145pb, respectivamente, lo que indica una menor eficiencia a la del 89% para fragmentos entre 100pb - 400pb ([Orita et al., 1989](#); [Hayashi 1991](#); [Sheffield 1993](#); [Gago-Zachart et al., 1998](#)).

¿Cómo se podría explicar esta menor sensibilidad?. La composición nucleotídica de los amplicones MG y CB, muestran un contenido de G+C (Tabla R2) cercanos al 40%. [Nataraj et al \(1999\)](#), obtuvo buena detección de fragmentos entre 100-300pb con 60% de G+C, mientras que secuencias de similar tamaño pero con un 40% de G+C no pudieron ser detectados. [Estrada-Cuzcano et al.,\(2005\)](#) tuvo dificultades en la detección de fragmentos de 183pb y 335pb con 38% y 36% de contenido G+C, respectivamente.

Es así que se plantea de manera particular para la región de control de la merluza peruana que posee un 37% de C+G, que la técnica de SSCP no ofrecería la sensibilidad necesaria para detectar mutaciones. Lo cual implica una desestimación de la verdadera diversidad genética mostrando un menor poder de resolución (en relación a la técnica de secuenciamiento).

Se recomienda en este caso el secuenciamiento directo de la región completa de las muestras estudiadas y por estudiarse, ya que la probabilidad de que dos muestras como mínimo sean iguales es un 9,5% (2 secuencias similares en un total de 21 secuencias, datos de secuenciamiento del presente estudio). Siendo así si analizamos 100 secuencias tenemos la probabilidad de detectar entre 9 -10 secuencias similares por el método de secuenciamiento directo, mientras que por

SSCP obtendríamos 70 secuencias supuestamente similares, dentro de las cuales habría un tercio ( $n=24$ ) ó un cuarto ( $n=16$ ) secuencias diferentes.

## **6.2. Subdivisión Poblacional de la Merluza.**

El análisis efectuado con la técnica de SSCP, revela la presencia de una sola unidad poblacional con baja diversidad genética (0.05% – 0.01% de variantes SSCP), asumiendo un alto flujo génico para explicar la amplia distribución de las variantes V4MG y V2CB. El análisis de las secuencias revela una alta diversidad genética (0.96%) con una distribución haplotípica local y sitios nucleotídicos distribuidos homogéneamente en la población debido a un alto flujo génico. A pesar de que ambas técnicas describen una sola unidad poblacional, el secuenciamiento ofrece una mayor sensibilidad en la caracterización de las poblaciones. Debido a que SSCP no detecta todas las variantes presentes.

Tanto las hipótesis de uno ó dos stock, se basan en una diferente interpretación de los caracteres fenotípicos observados. El presente estudio revela evidencia basada en caracteres genéticos que apoya la hipótesis de un solo stock de merluza, no detectando diferenciación poblacional y no alcanzando la significancia estadística necesaria ( $0 < p < 0.05$ ) para rechazar la hipótesis nula de un solo stock.

Bajo la hipótesis de un solo stock, la merluza peruana posee una migración latitudinal estratificada por tallas, en la cual los juveniles se hallan al sur y los adultos al norte ([Samame et al., 2001](#)). Bajo este modelo la zona de reclutamiento se halla al sur mientras que la de reproductores al norte. El haber detectado que los individuos 4002 (sur) y 5205 (norte), compartan el mismo haplotipo a pesar de estar separados por 450km y ser individuos con diferentes tallas (37 cm al norte y 14 cm al sur), lo cual sugiere que posiblemente 4002 es descendiente del linaje materno norteño de 5205 y que su llegada al sur se podría deber al efecto de ESCC. Así mismo la tasa de migrantes hembras por generación entre los distintos grupos poblacionales (norte,

centro y sur) es alta, lo que hace inferir un alto flujo de genes característico de una población panmíctica.

### **6.3. Otras Explicaciones a la Hipótesis de dos Stocks.**

Las observaciones que sustentan la hipótesis de dos stocks, posiblemente sean producto de diferencias entre estadios biológicos, de cambios naturales (p.e. ENSO) o antropogénicos (p.e. presión de pesca), que el presente estudio no se ve reflejado a nivel genético. Las diferencias observadas entre estos posibles stocks pueden explicarse como caracteres de dos fases de desarrollo de la misma especie (juveniles al sur y adultos al norte), algunas de los cuales se acentuaron por efecto del fenómeno ENSO 1997. Así distintos patrones de color y tamaño de captura ([Ward et al., 2001](#)) ó de longevidad, mortalidad y madurez sexual ([Lankford et al., 1999](#)) han servido para plantear la presencia de varios stocks en otras poblaciones marinas, pero evidencia genética no ha apoyado tales planteamientos, atribuyendo estas como adaptaciones a las condiciones espaciales o temporales. La evidencia fisiológica ([Perea et al., 2001](#)) demuestra que las diferencias reproductivas observadas en la merluza (madurez y actividad reproductiva temprana de individuos pequeños) es común durante eventos ENSO, el cual al modificar la temperatura, cambia el espectro alimentario y comportamiento reproductivo. Una explicación ecológica al respecto ([Wostnitza-Mendo y Guevarra-Carrasco, 2000](#)) plantea una modificación de su historia natural, en que la alta mortalidad de individuos adultos causa un incremento de la reproducción temprana de individuos pequeños, compensando así la disminución de la fecundidad (ocasionada por la pesquería), lo que mantiene altas tasas de fecundidad que hacen posible que el recurso resista la presión de pesca.

[Samame et al \(2001\)](#) discute estas diferencias en el comportamiento reproductivo, comentando que el fenómeno es explicable considerando la historia de la pesquería. Al comienzo la pesca extrajo los individuos más grandes incidiendo posteriormente sobre las tallas menores; esto no quiere decir que inicialmente no existieran tallas menores en reproducción, por ejemplo: se ha registrado en años normales merluzas



de tallas de 22-25 cm con gónadas maduras pero siempre en escasa cantidad, debido a la selectividad de la actividad pesquera por individuos de mayor tamaño quedando los pequeños. Acotando que la muestra que hace referencia la existencia de estos dos stocks, pertenece al crucero BIC Humboldt 9705-06, realizado en una época donde no ocurre la máxima reproducción, por lo que no sería representativo. Y que estos acontecimientos han ocasionado ciertas especulaciones como la reducción de las tallas del recurso y principalmente a la precocidad en la reproducción ([Wostnitzer-Mendo y Guevarra-Carrasco, 2000](#)).

#### **6.4. Posibles Linajes Mitocondriales.**

Aunque no tenemos indicios de dos ó más poblaciones separadas a nivel genético, si existen al menos dos linajes mitocondriales. Los resultados del análisis de varianza molecular, los test de diferenciación poblacional (tanto los basados en frecuencias de haplotipos y en similitud de secuencias) y el modelo de aislamiento por distancia no apoyen la hipótesis de dos stocks geográficamente separados. Pero la distribución mismatch bimodal la cual es corregida a una distribución unimodal cuando se elimina el linaje A, los resultados de la relación filogenética de los individuos analizados y de los haplotipos identificados (árbol NJ y red haplotípica, respectivamente), sugieren preliminarmente la presencia de dos linajes matrilineales sobrepuestos geográficamente, siendo el linaje B el de mayor presencia y distribución, mientras que el linaje A representado por pocos individuos se halla distribuido al sur. Con esta observación preliminar la zona en la cual los dos linajes se yuxtaponen corresponde geográficamente con el área de reclutamiento, mientras que el linaje B solo se localizaría en el área norte que correspondería a la de los reproductores ([Figura D1](#)). Para poder aseverar esto es necesario incrementar el tamaño de muestras. La presencia de estos linajes mitocondriales propuestos estaría sustentada por el análisis de caracteres genéticos y no por fenotípicos.

### **6.5. Estabilidad de los Tamaños Poblacionales de la Merluza.**

Los estadísticos de neutralidad sugieren que la merluza haya atravesado un proceso de expansión poblacional reciente que no puede ser calculado con mayor precisión debido a que no se dispone de calibración del reloj molecular en este taxa. Por tal motivo se usó el estimado en otras especies, por lo que el escenario planteado es hipotético y basado en una tasa de mutación moderada.

[Grant y Bowen \(1998\)](#), proponen cuatro escenarios básicos de historia poblacional basados en los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica en especies marinas. Peces con alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, probablemente sufrieron esta expansión poblacional después de un periodo de bajo tamaño efectivo poblacional. Los datos del presente estudio apoyan este escenario para la merluza peruana.

Los dos linajes detectados pueden relatar historias filogeográficas diferentes, pero en el presente estudio se incluye el total de muestras para efectuar los estimados de tiempo de expansión, los cuales describen una época aproximada a los 12 000 años, el cual comprende el período del final del Pleistoceno y de la última glaciación. Estos eventos climáticos pueden afectar drásticamente a las poblaciones marinas, modificando la concentración de nutrientes ([Beaugrand y Reid., 2003](#)), la temperatura del agua ([Hayes et al., 2005](#)) ó el hábitat ([Tolley et al., 2005](#)).

Así se plantea la hipótesis de que la última expansión está relacionada con la recolonización de la plataforma continental norperuana por la merluza, al final del período glacial. Evidencia paleogeográfica ([Ortlieb y Machare, 1989](#)), sugiere que en la costa peruana el nivel del mar disminuyó 120m, siendo el área de mayor desplazamiento entre 7°S - 9°S, quedando la Bahía de Sechura y el Golfo de Guayaquil totalmente emergidos, desplazándose la línea costera 20Km al oeste de la costa actual entre Paita y Negritos, y una emersión de pocos kilómetros al norte de Talara. Bajo este modelo, el hábitat de la merluza que se corresponde con la extensión de la plataforma continental se ve disminuido drásticamente, posiblemente causando

una disminución de sus tamaños poblacionales. Al terminar el período glacial, se incrementa el nivel del mar inundándose el antiguo hábitat de la merluza, permitiendo la recolonización de su antiguo hábitat y así produciéndose la expansión poblacional del recurso.

#### **6.6. Implicancias del Estudio al Manejo Pesquero.**

La historia de los estudios genéticos y su influencia en el manejo pesquero se halla bien descrito en el caso de la merluza europea, donde los primeros estudios basados en marcadores bioquímicos no revelan diferenciación, esta sensibilidad ha sido mayor al usar marcadores alozímicos y posteriormente marcadores microsatélites ([Mangaly y Jamieson, 1979](#); [Roldan et al., 1998](#); [Lundy et al., 1999](#)), revelando que la merluza europea presenta una estructuración compleja. A diferencia del hábitat de la merluza peruana, el de la merluza europea presenta evidentes barreras geográficas pero es posible que otras barreras como la presión batimétrica, extensión de la plataforma continental y presencia de corrientes marinas, estén actuando y que posiblemente puedan ser detectadas variando la estrategia metodológica.

Los resultados del presente estudio hacen posible definir preliminarmente a la merluza peruana como una sola unidad poblacional en panmixis, cuyo acervo genético matrilineal se ve reflejado en dos linajes yuxtapuestos geográficamente posible consecuencia de la recolonización de la plataforma continental, dentro del área de muestreo del presente estudio (3°S - 7°S).

Esta viene a ser la definición biológica como población en base al análisis genético realizado. Pero el concepto de stock involucra una actividad multidisciplinaria que asegure la estabilidad de los tamaños poblacionales con énfasis a mantener el rendimiento de una actividad industrial como lo es la pesquería. Aunque se define a población como unidad panmíctica otros criterios son necesarios para delimitar la actividad pesquera.

Este estudio establece relaciones espaciales pero no temporales. Es así que es necesario establecer relaciones temporales que nos ayuden a inferir si estas observaciones se mantienen o varían. Es así que la presente investigación puede ser usada como herramienta de comparación con futuros estudios.

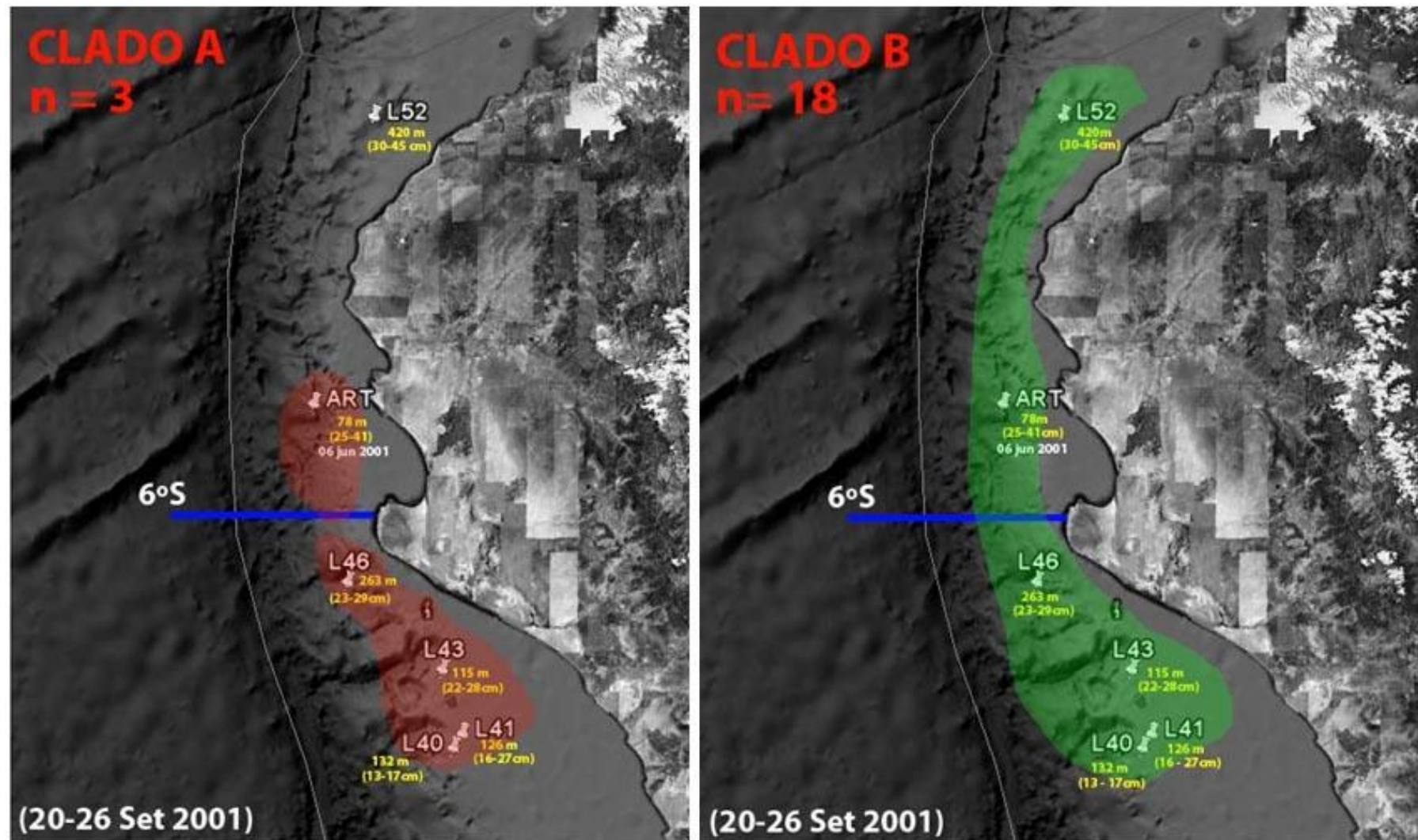
Aunque el marcador mitocondrial empleado no revele diferenciación poblacional, otros marcadores sean más sensibles, como por ejemplo los microsátélites. Pero ambos son tratados como marcadores neutrales. Una característica de las poblaciones marinas en comparación a las terrestres es el mantenimiento de enormes tamaños poblacionales que pueden amortiguar el efecto de la deriva génica y la migración que son la base sobre la cual se hacen las estimaciones con los marcadores neutrales. Es allí donde es necesario emplear otro tipo de marcadores que sean sensibles a selección la cual puede deberse a adaptaciones locales que sirvan para la distinción de unidades poblacionales.

Por ejemplo, aunque los datos sustentan genéticamente una unidad panmíctica de merluza eso podría provocar estimar cuotas de pesca para la población total (adultos y jóvenes) en toda su área de distribución. Pero si adicionalmente, se considera la estratificación de tallas y áreas de reclutamiento, la pesquería se restringiría en determinadas regiones. Por lo tanto la información genética proporcionada es complementaria a la data existente con el fin de tener un panorama amplio que brinde información a los entes gestores de este recurso y similares.

El estudio se basa en la descripción del componente genético según un marcador mitocondrial cuya herencia es mediada por hembras. Esta especie es sexualmente diferenciada por lo que marcadores nucleares son necesarios para tener una caracterización genética general. Los marcadores genéticos son sensibles al modo de transmisión hereditaria, en algunas especies las hembras tienen comportamiento filopátrico y los machos son los agentes de dispersión. Este diferente comportamiento se refleja en la estructura genética. Se conoce que las hembras de merluza son más bentónicas mientras que los machos prefieren la columna de agua, por eso la pesca

de arrastre captura más hembras que machos, además de que las hembras alcanzan mayores tallas que los machos.

.



**Figura D 1.** Distribución geográfica de los Clados A y B de la merluza peruana.

## VII. CONCLUSION.

Este estudio es una primera contribución hacia el conocimiento de la genética poblacional empleando secuencias de ADNmt en un recurso pesquero económicamente importante, concluyendo preliminarmente que se trataría de una sola unidad genética poblacional de *Merluccius gayi peruanus*, en el mar norperuano, conformada a su vez por dos linajes mitocondriales. Para fortalecer esta conclusión es necesario incrementar el tamaño de muestra y emplear conjuntamente otros marcadores.

El estudio proporciona evidencia a favor de la hipótesis de un solo stock y adicionalmente describe parte de la historia evolutiva de este recurso.

El empleo de cebadores de PCR conservados para amplificar la región de control mitocondrial completa es una gran ayuda para obtener información útil y procesable en especies de las cuales no se tiene reportada información genética poblacional.

La técnica de SSCP puede ayudar como técnica de presecuenciamiento, pero en la región de control que posee varios sitios polimórficos, es más recomendable tanto por tiempo y economía, el secuenciamiento directo. Posiblemente su uso en otros objetos de estudio; por ejemplo, en regiones codificantes donde la tasa de mutación es menor, la técnica de SSCP es más recomendable.

## VIII. RECOMENDACIONES.

- Incrementar el número de muestras a 20 -30 por área de muestreo y que estas se hallan en proporciones de igualdad entre machos y hembras por lugar de muestreo.
- Incluir en la estrategia de muestreo además del latitudinal efectuado, otro que considere la distancia con la línea costera, debido a que el stock se halla sobre la plataforma o se halla en el borde de la misma. Así se tendría una mejor representación espacial de la población.
- Incluir en lo posible muestras de *Merluccius angustimanus* que hayan sido colectadas en la misma temporada.
- Emplear adicionalmente marcadores nucleares neutrales como son los microsatélites e intrones para un análisis multilocus que pueda incrementar así la sensibilidad hacia la posible detección de diferenciación genética.
- Estudiar otras especies marinas que posean un rango de distribución geográfica similar para poder realizar inferencias filogeográficas sobre el mar del norte peruano.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. BREMER, JR, A.J. BAKER y J. MEJUTO. 1995. Mitochondrial DNA Control Region Sequences Indicate Extensive Mixing of Swordfish (*Xiphias gladius*) Populations in the Atlantic Ocean. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* **52**, 1720-1732.
2. AMOS, W. Y A. BALMFORD. 2001. When does conservation genetics matter?. *Heredity* 87: 257-265.
3. ARMSTRONG, D. 1981. Investigación de la merluza en IMARPE. Inf.Inst. Mar Perú-Callao 79(1), 47 p.
4. BALLARD, J. y M.D. DEAN. 2001. The Mitochondrial Genome: Mutation, Selection and Recombination. *Current Opinion in Genetics y Development* 11:667-672.
5. BASTOS, E., A. CRAVADOR, J. AZEVEDO, J., y H. GUEDES-PINTO. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5(1):7-15.
6. BEAUGRAND, G., P.C. REID. 2003. Long-term changes in phytoplankton, zooplankton and salmon related to climate. *Global Change Biol.* 9, 801–817.
7. BILLINGTON, N. 2002. Chapter 4: Mitochondrial DNA. In: *Population Genetics: Principles and Practices for Fisheries Scientists*. Por Erik Hallerman. Publicado por American Fisheries Society. Junio. ISBN: 1888569271.
8. CAMPO, D. G. MACHADO-SCHIAFFINO, J. PEREZ y E. GARCIA-VAZQUEZ. 2007. Phylogeny of the genus *Merluccius* based on mitochondrial and nuclear genes. *Gene* 406: 171-179.
9. CARR, S.M. y H.D. MARSHALL. 2008. Phylogeographic analysis of complete mtDNA genomes from Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus* Pallas, 1811) shows an ancient origin of genetic biodiversity. *Mitochondrial DNA* 19(6): 490-496.
10. CASTILLO, R., SAMAME, M., FERNÁNDEZ, F. Distribución y Estructura Poblacional de la Merluza Peruana (*Merluccius gayi peruanus*). *Forum-La Merluza Peruana*.(Publicación online) 2001 Octubre (visitado 3 de diciembre 2002). Disponible en URL: [http://www.imarpe.gob.pe/informes/info\\_merluza/distribucion.html](http://www.imarpe.gob.pe/informes/info_merluza/distribucion.html)
11. CASTILLO A.G.F., P. ALVAREZ y E. GARCIA-VAZQUEZ. 2005. Population structure of *Merluccius merluccius* along the Iberian Peninsula coast. *ICES Journal of Marine Science* 62: 1699-1704.
12. CLEMENT, M. D. POSADA y K. CRANDALL. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
13. COHEN, D.M., INADA T., IWAMOTO T. y SCIALABBA N. 1990. FAO Species Catalogue. Gadiform fishes of the world: Orden Gadiformes, an annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. FAO Fish Sinopsis 125 (10) – 442pp

14. DE WOODY, J., J: AVISE. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater, and andromous fishes compared with other animals. J. Fish Biol. 56, 461–473.
15. ESPINO, M. 1999. La merluza peruana (*Merluccius gayi* peruanus): Situación Actual y Perspectivas de Explotación. INF. Prog. Int. Mar. Perú. 98: 20p.
16. ESPINOZA, J. Alimentación De La Merluza (*Merluccius gayi* peruanus) y sus Fluctuaciones en el Tiempo. (Publicación Online) 2001 Octubre (visitado 3 de diciembre 2002). Disponible en URL: [http://www.imarpe.gob.pe/informes/info\\_merluza/forum\\_exposiciones/raul\\_flores.htm](http://www.imarpe.gob.pe/informes/info_merluza/forum_exposiciones/raul_flores.htm)
17. ESTRADA-CUZCANO, A., J. SANDOVAL, M.L. GUEVARA-FUJITA y R. FUJITA. 2005. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. Rev. peru. biol. 12(3): 349- 358.
18. EYRE-WALKER, A. y P. AWADALLA. 2001. Does Human mtDNA Recombine?. J. Mol. Evol. 53:430-435.
19. EXCOFFIER, L., G. LAVAL y S. SHENEIDER. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.
20. EXCOFFIER, L., P. SMOUSE, P. y J. QUATTRO. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491.
21. FLORES R. 2001.Flota y Plantas Pesqueras dedicadas a la Merluza Peruana. Forum- La Merluza Peruana. (Publicación Online) 2001 Octubre (visitado 3 de diciembre 2002). Disponible en URL: [http://www.imarpe.gob.pe/informes/info\\_merluza/forum\\_exposiciones/raul\\_flores.htm](http://www.imarpe.gob.pe/informes/info_merluza/forum_exposiciones/raul_flores.htm)
22. FLOWER, JM., FOLTZ,DW. 2001. Reconciling molecular systematics and traditional taxonom in a species-rich clade of sea stars (Leptasterias subgenus Hexasterias). Marine Biology 139:475-483.
23. FU, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915-925.
24. GALLEGUILLOS R., L. TRONCOSO, C. OYARZUN, M. ASTORGA y M. PEÑALOZA. 2000. Genetic differentiation in Chilean hake *Merluccius gayi* (Pisces: Merlucciidae). Hydrobiologia 420(1):49-54.
25. GAGO-ZACHART, SP., COSTA, NB., SEMORILE, L.,GRAU, O. 1999. Sequence variability in p27 gene of Citrus Tristeza Virus (CTV) revealed by SSCP analysis. Electronical Journal of Biotechnology Abril, 2(1):41-50.
26. GINSBURG, I. 1954. Whittings on the coast of the American continents. Fishery Bulletin US 56: 187-208.
27. GRANT, W.S., B.W. BOWEN. 1988. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J. Hered. 89: 415–426.

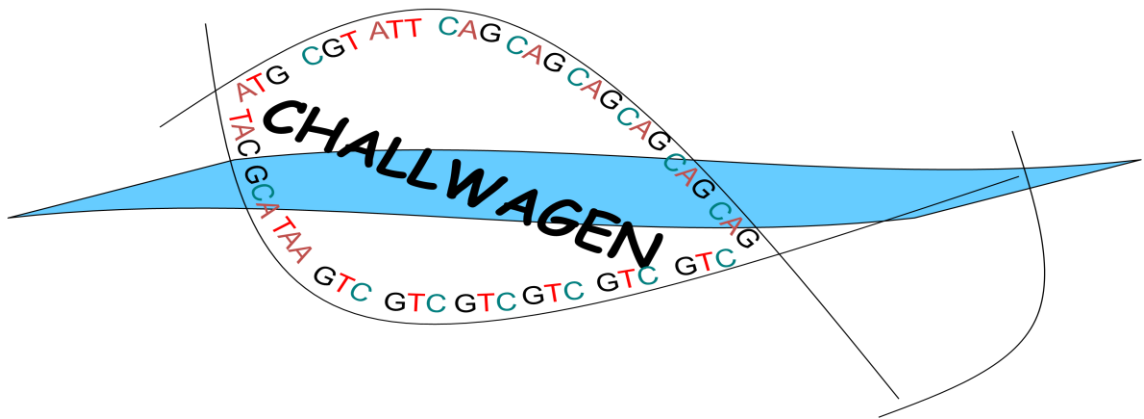
28. GROSBERG, R. Y CUNNINGHAM, CW. 2001. Genetic Structure in the Sea from Populations to Communities. Páginas 61-84. En M.D. Bertness. S.D. Gaines and M.E. Hay, eds. Marine Community Ecology, Sinauer, Sunderland, Massachussets.
29. GUEVARA-CARRASCO, R. 1995. Análisis de la Estructura Poblacional y de las capturas de Merluza (*Merluccius gayi peruanus*) en Agosto de 1995. Inf. Inst. Mar. Perú, 14:13p.
30. GUEVARA-CARRASCO, R. 1996. La Pesquería de la Merluza: Situación Actual. Inf. Inst. Mar. Peru 27:41p.
31. GUEVARA-CARRASCO, R. 1997. Resultados Generales del Crucero de Evaluación del Stock de Merluza en Otoño de 1997: BIC Humboldt 9705-06, Callao a Puerto Pizarro. Inf. Inst. Mar. Peru 128: 7-11.
32. HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
33. HAYES, G.C., A.J. RICHARDSON, C. ROBINSON. 2005. Climate change and marine plankton. Trends Ecol. Evol. 20, 337–344.
34. HAYASHI, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutatioin in genomic DNA. PCR Methods Appl. 1-34.
35. HEIST, E.J. y J.R. GOLD. 1999. Genetic identification of Sharks in the U.S. Atlantic large coastal shark fishery. Fish Bull. 97: 53-61.
36. HEYDEN, S., M.R. LIPINSKI y C.A. MATTHEE. 2007. Mitochondrial DNA analyses of the Cape hakes reveal an expanding, panmictic population for *Merluccius capensis* and population structuring for mature fish in *Merluccius paradoxus*. Molecular Phylogenetics and Evolution 42: 517–527.
37. HERNANDEZ, C., R. GALLEGUILLOS y C. OYARZUN. 2000. Diferenciación genética de *Merluccius gayi gayi* y *Merluccius gayi peruanus* (Pisces, Merluciidae) y antecedentes paleográficos de su área de distribución. Revista Chilena de Historia Natural 73: 23-29.
38. HUDSON, R.R., D.D. BOOS, y N. L. KAPLAN. 1992. A statistical test for detecting population subdivision. Mol. Biol. Evol. 9: 138-151.
39. HUDSON, R. R. 2000. A new statistic for detecting genetic differentiation. Genetics 155: 2011-2014.
40. HUMPHRIES, SE., V. GUDNASON, R. WHITTALL, y I.N.M. DAY. 1997. Single-Strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesteremia. Clinical Chemistry 43(3): 427-435.
41. INADA, T. 1981. Studies on the Merluccidae fish. Bull. Far. Seas Fish Res. Laboratory, Shimizu, Japan, 18, 1-172.
42. IWAMOTO, E., M.J. FORD y R.G. GUSTAFSON. 2004. Genetic Population Structure of Pacific Hake, *Merluccius productus*, in the Pacific Northwest. Environmental Biology of Fishes. 69(1-4):187-199.

43. JENSEN, J.L., A.J. BOHONAK, y S.T. KELLEY. 2005. Isolation by distance, web service. BMC Genetics 6: 13. v.3.16
44. JOHANSEN, BI. 1996. The Complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*): relevance to taxonomic studies among codfishes. Mol Mar Biol Biotechnol 5(3):203-214.
45. JÓNSDÓTTIR, Ó.D.B., A.K. DANÍELSDÓTTIR y G. NAEVDAL. 2001. Genetic differentiation among Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in Icelandic waters: temporal stability. ICES Journal of Marine Science, 58: 114–122.
46. LANKFORD, TE., TARGETT, TE. y GAFFNEY, PM. 1999. Mitochondrial DNA analysis of population structure in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (Perciformes:Scnidae). Fish. Bull. 97:884-890.
47. LUNDY, JC., MORAN, P., RICO, C., MILNER, RS., y HEWITT, GM. 1999. Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case stud of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish. Mol. Ecol. 8(11): 1889-1898.
48. LUNDY, JC., C. RICO, C. y G.M. HEWITT. 2000. Temporal and Spatial genetic variation in spawning grounds of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay. Mol Ecol. 9(12): 2067
49. LLORIS, D.S., J.MATALLANAS y P. OLIVER. 2003. Merluzas del mundo (Familia Merlucciidae). Catálogo comentado e ilustrado de las merluzas conocidas. FAO. FAO Catálogo de Especies para los Fines de la Pesca 2. 57pp.
50. MAGOULAS, A. y ZOUROS, E. 1993. Restriction-Site Heteroplasmy in Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. 10(2): 319-325.
51. MAEKAWA, K., KON, M., ARAYA, K. y MATSUMOTO, T. 2001. Phylogeny and Biogeography of Wood-Feeding Cockroaches, Genuc Salganea Stal (Blaberidae: Panesthiinae), in Southeast Asia Based on Mitochondrial DNA Sequences. J. Mol. Evol 53:651-659.
52. MANGALY, G. y A. JAMIESON. 1979. Genetics tags applied to the European hake, *Merluccius merlucius* (L.). Anim. Blood. Groups. Biochem. Genet. 10(1):39-48.
53. MCLEAN, J.E. y E.B. TAYLOR. 2001. Resolution of population structure in a species with high gene flow: microsatellite variation in the eulachon (Osmeridade: *Thaleichthys pacificus*). Marine Biology 139:411-420.
54. MEJÍA, J.; J. VÉLEZ Y H. ALARCÓN. 1974. Contraste de hipótesis como un medio a juzgar la identidad de la merluza en el área peruana. Ser. Inf. Esp. Inst. Mar Perú 159: 16 pp.
55. MINAYA, P. 2001. Breve Reseña de las Principales Especies de Merlúcidos a nivel mundial 1970 – 1998. Forum-La Merluza Peruana. (Publicación online) 2001 Octubre. (visitado 3 de diciembre 2002). Disponible en URL: [http://www.imarpe.gob.pe/informes/info\\_merluza/merlucidos.html](http://www.imarpe.gob.pe/informes/info_merluza/merlucidos.html)

56. MORAN, P., C. LUNDY, C. RICO y G.M. HEWITT. 1999. Isolation and characterization of microsatellite loci in European hake, *Merlucius merlucius* (Merlucidae, Teleostei). *Molecular Ecology* 8(8): 1357-1358.
57. MUTHS, D., P. GREWE, C. JEAN y J. BOURJEA. 2009. Genetic population structure of the Swordfish (*Xiphias gladius*) in the southwest Indian Ocean: Sex-biased differentiation, congruency between markers and its incidence in a way of stock assessment. *Fisheries Research* 97: 263-269.
58. NATARAJ, A., I. OLIVOS-GLANDER, N. KUSUKAWA, y E. HIGHSMITH. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*. (20): 1117-1185.
59. NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323
60. NEIGEL, JE. 1994. Análisis of Rapidly Evolving Molecules and DNA Sequence Variant: Alternative Approaches for Detecting Genetic Structure in Marine Populations. *CalCOFI Rep* 35:82-89
61. NEETHLING, M.; MATTHEE, C.A.; BOWIE, CK y HEYDEN, S. 2008. Evidence for panmixia despite barriers to gene flow in the southern African endemic, *Caffrogobius caffer* (Teleostei: Gobiidae). *BMC Evolutionary Biology* 8:325. Disponible en URL: This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/325>.
62. ORBACZ, E.A. y P.M. GAFFNEY. 2000. Genetic Structure of tautog (*Tautoga onitis*) populations assayed by RFLP and DGGE analysis of mitochondrial and nuclear genes. *Fish. Bull.* 98:336-344.
63. ORTLIEB, L., J. MACHARE. 1989. Evolución Climática al Final del Cuaternario en las Regiones Costeras del Norte Peruano: Breve Reseña. *Bull. Inst. fr. Et. andines* 18(2): 143-160.
64. OYARZUN, C. 1997. Estudios microevolutivos en *Merluccius gayi gayi*. Ph D.Tesis. Universidad de Concepción Chile.
65. ORITA, M., Y. SUSUKI, T. SEKIYA y K. HAYASHI. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism. *Genomics* 5:874-879.
66. PLA, C., A. VILA y J.L. GARCIA-MARIN. 1991. Differentiation de stocks de merlu (*Merluccius merluccius*) par l'analyse génétique: comparaison de plusieurs populations méditerranéennes et atlantiques du litoral espagnol. *FAO, Rapports sur les Pêches*, 447, 87-93.
67. PALUMBI, S.R. y C.S. BAKER. 1994. Contrasting Population Structure from Nuclear Intron Sequences and mtDNA of Humpback Whales. *Mol. Biol. Evol* 1(3): 429-435.
68. PEREA, A., B. BUITRÓN y E. MECKLENBURG. EL NIÑO 1997-98 Y LA REPRODUCCIÓN DE LA MERLUZA *Merluccius gayi peruanus* EN EL PERÚ. En: J. TARAZONA, W. E. ARNTZ Y E. CASTILLO DE MARUENDA (eds). 2001. *El Niño en América Latina: 91. Impactos Biológicos y Sociales*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Lima, pp. 91-95.

69. QUINTEIRO, J., R. VIDAL y M. REY-MÉNDEZ. 2000. Phylogeny and biogeographic history of hake (genus *Merluccius*) inferred from mitochondrial DNA control-region sequences. *Marine Biology* 2000, 136:163-174.
70. QUINTEIRO J., R. VIDAL, M. IZQUIERDO, C.G. SOTELO, M.J. CHAPELA, R.I. PÉREZ-MARTÍN, H. REHBEIN, G.L. HOLD, V.J. RUSSELL, S.E. PRYDE, C. ROSA, A.T. SANTOS, M. REY-MÉNDEZ. 2001. Identification of Hake species (*Merluccius* Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J Agric Food Chem.* Nov;49(11):5108-14.
71. RAMOS-ONSINS, S. E. and J. ROZAS. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.
72. RAYMOND, M. y F. ROUSSET. 1995 An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
73. RENSHAW, M.A., D.S. PORNTROY, R. VIDAL y J. GOLD. 2010. Isolation and characterization of microsatellite markers in the southern hake, *Merluccius australis*. *Conservation Genetics Resources*. OnLine First, 2 August 2010.
74. RODRIGUES, R., H. SCHNEIDER, S. SANTOS, M. VALLINOTO, U. SAIN-PAUL y I. SAMPAIO. 2008. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 31 (2): 487-492.
75. ROGERS, A.R. y H. HARPENDING. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552–569.
76. ROLDAN, MI., GARCIA-MARIN, JL. UTTER, FM. Y PLA, C. 1998. Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*. *Heredity* 81:327-334.
77. ROLDAN, MI., J.L. GARCÍA-MARÍN, F.M. UTTER, Y C. PLA. 1999. Genetic relationships among *Merluccius* species. *Heredity* 83: 79-86.
78. ROZAS, J., J.C. SÁNCHEZ-DELBARRIO, X. MESSEGUER y R. ROZAS. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
79. RUZZANTE, D.E., C.T. TAGGART Y D. COOK. 1998. A nuclear DNA basis for shelf- and bank-scale population structure in northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*): Labrador to Georges Bank. *Molecular Ecology* 7:1663-1680.
80. SAMAME, M., P. AYON, F. RODRIGUEZ. 2001. Reproducción de la Merluza Peruana. Forum: La Merluza Peruana. (Publicación online) 2001 Octubre (visitado 3 de diciembre 2002). Disponible en URL: [http://www.imarpe.gob.pe/informes/info\\_merluza/reproduccion.htm](http://www.imarpe.gob.pe/informes/info_merluza/reproduccion.htm)
81. SANG, T., H. CHANG, CHEN, CH. CHEN, y CH. Hui. 1994. Population Structure of the Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Mol. Biol. Evol.* 11(2): 250-260.
82. SHEFFIELD, VC., J.S. BECK, A.E. KWITEK, D.W. SANDSTROM, y E.M. STONE. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitution. *Genomics* 1993, 16: 325-332.

83. SIGURGÍSLASON, H., E. ÁRNASON. 2003. Extent of mitochondrial DNA sequence variation in Atlantic cod from the Faroe Islands: a resolution of gene genealogy. *Heredity* 91, 557–564.
84. SKIBINSKI, DOF., GALLAGHER, C., BEYNON, CM. Sex-Limited Mitochondrial DNA Transmission in the Marine Mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 1994, 138:801-809.
85. STABILE J., JR WALDMAN, F. PARAUKA y I. WIRGIN. 1996. Stock Structure and Homing Fidelity in Gulf of Mexico Sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) based on Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Analyses of Mitochondrial DNA. *Genetics* 144(2): 767-775.
86. SUNNUCKS, P., A.C.C. WILSON, L.B. BEHEREGARAY, K., K. ZENGER, J. FRENCH Y A.C. TAYLOR. 2000. SSCP is not so difficult: the applications and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* 2000 (9):1699-1710.
87. TAMURA K., J. DUDLEY, M. NEI y S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
88. TAJIMA, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597-601.
89. THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS y T.J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, submitted, June.
90. TOLLEY, K.A., J.C. GROENEVELD, J. C. GOPAL, K., C.A. MATTHEE. 2005. Mitochondrial DNA panmixia in spiny lobster *Palinurus gilchristi* suggests a population expansion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 297, 225–231.
91. YAP, EPH. y J.D. MCGEE. 1994. Chapter 20: Non Isotopic Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis of PCR products. *PCR Technology Current Innovations*. CRC Press Inc. pp 165-177.
92. WARD, R.D., S.A. APPELYARD, R.K. DALEY Y A. REILLY. Population structure of ping ling (*Genypterus blacodes*) from south-eastern Australian waters, inferred from allozyme and microsatellite analyses. *Mar. Freshwater Res.* 2001, 52: 965-973.
93. WILEY, E.O., G.D. JONSON, y W.W. DIMMICK. 2000. The interrelationships of acanthomorph fishes: a total evidence approach using molecular and morphological data. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 319-350
94. WOSTINZA-MENDO, C. Y GUEVARRA-CARRASCO, R. 2000. Adaptive Response of Peruvian Hake to Overfishing. *Naga, The ICLARM Quarterly* 23(1):24-28.



Logo del Proyecto elaborado en conjunto con el compañero Alan Marín Hertz.



[danielsaulpe@yahoo.es](mailto:danielsaulpe@yahoo.es)

[danielore@hotmail.com](mailto:danielore@hotmail.com)

Cel: 996996115

Casa: 2914142